

Tesis Doctoral

Efecto del campo eléctrico en la reactividad de porfirinas y hemoproteínas

De Biase, Pablo Martín

2008

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

De Biase, Pablo Martín. (2008). Efecto del campo eléctrico en la reactividad de porfirinas y hemoproteínas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

De Biase, Pablo Martín. "Efecto del campo eléctrico en la reactividad de porfirinas y hemoproteínas". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2008.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA INORGÁNICA ANALÍTICA Y QUÍMICA
FÍSICA

Efecto del campo eléctrico en la reactividad de porfirinas y hemoproteínas

Tesis presentada para optar por el título de
Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área Química Inorgánica
Analítica y Química Física

Autor: **Pablo Martín De Biase**

Directores de Tesis: **Fabio Doctorovich**
Darío A. Estrin

Consejero de Estudios: **Daniel Laría**

Lugar de trabajo: Departamento de Química Inorgánica, Analítica y Química Física. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. INQUIMAE- CONICET.

Buenos Aires, 2008

a la mamá y a mi bebé, mi familia,
mis seres queridos y a los que me quieren

Resumen

En la presente tesis se ha estudiado cómo afecta el campo eléctrico a las reacciones redox y de coordinación de ligandos en hemoproteínas de membrana y en porfirinas aisladas. Las porfirinas fueron utilizadas como sistemas modelo del sitio activo de estas proteínas. En principio, a través de cálculos de estructura electrónica, se determinó cómo influye el campo eléctrico en la energía de reacciones redox y de coordinación de ligandos en sistemas modelos de sitios activos de hemoproteínas típicas. Con el fin de realizar un estudio experimental, se escogió una reacción en la cual se predijo computacionalmente que el efecto del campo eléctrico sería importante. Por medio de la técnica SERRS (*Surface Enhanced Resonance Raman Scattering*), se midió para este sistema la constante de equilibrio de coordinación de un ligando soluble a una porfirina inmovilizada en superficie a distintos potenciales eléctricos aplicados. Posteriormente, utilizando dos estrategias distintas, se estimó la magnitud del campo eléctrico presente a cada potencial de estos experimentos. Finalmente, se estudió utilizando dinámica molecular clásica, el efecto del campo eléctrico en la reacción de disociación de un ligando en la hemoproteína completa citocromo c. Se encontró que no existe efecto del campo eléctrico sobre el sitio activo pero si sobre el resto de la proteína. Se pudo comprender como actúa un campo eléctrico modulando una reacción química tanto en sistemas pequeños y rígidos como las porfirinas, y en sistemas grandes y flexibles como las proteínas. Se identificaron cuáles son las características que debe poseer tal proceso para que sea afectado por el campo eléctrico.

Palabras Claves: campo eléctrico, porfirina, hemo, hemoproteína, citocromo c, efecto Stark, Raman, Raman Resonante, SERRS, SERS, DFT, dinámica molecular, métodos ab-initio, frecuencias vibracionales, electroquímica, XPS, STM, cinética, equilibrio, reacciones redox, potencial redox, reacciones de coordinación, imidazol, metionina, Zn, Fe, constante de equilibrio.

Abstract

The goal of this thesis was to investigate how an electric field affects redox and ligands coordination reactions in membrane hemeproteins and in porphyrins as model systems of the active site of these proteins. In the first place, by means of quantum calculations, it was determined the influence of the electric field over redox and ligands coordination reactions energies in model systems of typical hemeprotein active sites. It was selected a reaction affected by the electric field to prove experimentally the predicted effects. Using the SERRS (Surface Enhanced Resonance Raman Scattering) technique, it was measured, for this chosed system, equilibrium constants of ligands coordination to surfaces immobilized porphyrins while applying different electric potentials. Then, using two different strategies, it was determined the electric field magnitudes present in the previous experiments. Finally, it was studied by means of classical molecular dynamics the electric field effects in a ligand dissociation reaction in cytochrom c where it was found that there was no electric field effect at the active site but there were significant effects on the protein conformation and dynamics. It was concluded how an electric field modulates a chemical reaction in small and rigid systems as porphyrins, and in big and flexible systems as proteins. It was found which are the characteristics that a process should have to be affected by the field.

keywords: *electric field, porphyrin, heme, hemeprotein, cytochrome c, Stark effect, Raman, Resonant Raman, SERRS, DFT, SERS, molecular dynamic, ab-initio methods, vibrational frequencies, electrochemistry, XPS, STM, kinetic, equilibrium, redox reaction, redox potential, coordination reaction, imidazole, methionine, Zn, Fe, equilibrium constant.*

Índice general

I	Introducción general	1
I.1.	Introducción	3
I.1.1.	Definición y relaciones del campo eléctrico	3
I.1.2.	Reacciones químicas y campos eléctricos	5
I.1.3.	Objetivos	7
I.1.4.	Organización	7
I.1.5.	Bibliografía	8
II	Metodología general	9
II.1.	Métodos experimentales	11
II.1.1.	Aspectos generales	11
II.1.2.	Instrumentación	11
II.1.3.	Tratamiento de datos mediante descomposición de valores singulares . . .	17
II.2.	Métodos computacionales	21
II.2.1.	Modelos basados en la mecánica cuántica	22
II.2.1.1.	Mecánica cuántica	22
II.2.1.1.1.	Teorema variacional	23
II.2.1.1.2.	Teoría de perturbaciones	24
II.2.1.2.	<i>Métodos ab-initio</i>	25
II.2.1.3.	Teoría del funcional de la densidad	30
II.2.1.4.	Aplicación de un campo eléctrico uniforme externo	33
II.2.2.	Modelos clásicos	35
II.2.3.	Superficie de energía potencial	36
II.2.4.	Espectroscopía vibracional de moléculas poliatómicas	38
II.2.5.	Simulaciones de dinámica molecular dirigidas	41
II.2.6.	Modelado del solvente	42

II.2.7. Programas utilizados	42
II.2.8. Programas efectuados	44
II.3. Bibliografía	47
 III Desarrollo	 51
III.1.Efecto del campo eléctrico en la reactividad de porfirinas	53
III.1.1. Introducción	53
III.1.2. Métodos computacionales y modelos	54
III.1.3. Resultados y Discusión	55
III.1.3.1. Efectos del campo eléctrico en potenciales de reducción	57
III.1.3.2. Efectos del campo eléctrico en la afinidad de ligandos	61
III.1.4. Conclusiones	63
III.1.5. Bibliografía	64
 III.2.Efecto del campo eléctrico en la coordinación de ligandos a porfirinas	 67
III.2.1. Introducción	67
III.2.2. Métodos	69
III.2.2.1. Inmovilización y caracterización	69
III.2.2.2. Medición de la constante de equilibrio en superficie	70
III.2.2.3. Medición de constante de equilibrio en solución	72
III.2.3. Resultados y Discusión	72
III.2.3.1. Inmovilización y caracterización	72
III.2.3.2. Medición de la constante de equilibrio en superficie	74
III.2.3.3. Medición de la constante de equilibrio en solución	83
III.2.4. Conclusiones	87
III.2.5. Bibliografía	88
 III.3.Estimación del campo eléctrico usando la teoría de la doble capa	 91
III.3.1. Introducción	91
III.3.2. Teoría	92
III.3.3. Métodos	97
III.3.3.1. Descripción general	97
III.3.3.2. Determinación del área promedio del electrodo	98
III.3.3.3. Determinación del potencial de carga cero	99
III.3.3.4. Determinación de la capacidad	99

III.3.3.5. Cálculos computacionales	100
III.3.4. Resultados y Discusión	101
III.3.4.1. Determinación del área del electrodo	101
III.3.4.2. Determinación del potencial de carga cero	102
III.3.4.3. Determinación de la capacidad y estimación del campo eléctrico	104
III.3.4.4. Cálculos computacionales y análisis teórico-experimental	111
III.3.5. Conclusiones	116
III.3.6. Bibliografía	117
III.4. Estimación del campo eléctrico usando el efecto Stark vibracional	119
III.4.1. Introducción	119
III.4.2. Teoría	120
III.4.3. Métodos	121
III.4.3.1. Determinación del coeficiente de variación Stark	121
III.4.3.2. Medición del corrimiento vibracional	122
III.4.4. Resultados y Discusión	123
III.4.4.1. Determinación del coeficiente de variación Stark	123
III.4.4.2. Medición del corrimiento vibracional	127
III.4.4.3. Estimación del campo eléctrico	130
III.4.5. Conclusiones	131
III.4.6. Bibliografía	132
III.5. Efecto del campo eléctrico en la coordinación de ligandos en proteínas	135
III.5.1. Introducción	135
III.5.2. Métodos computacionales	137
III.5.2.1. Preparación del sistema	137
III.5.2.2. Parámetros de la simulación de dinámica molecular	137
III.5.2.3. Aplicación de un campo eléctrico homogéneo	138
III.5.2.4. Perfiles de energía libre de la transición de coordinación	138
III.5.2.5. Cálculo del momento dipolar eléctrico	140
III.5.2.6. Contribución energética debido al campo eléctrico	140
III.5.2.7. Cálculo de parámetros termodinámicos	140
III.5.3. Resultados	141
III.5.3.1. Estructura y dinámica de los estados coordinados	141
III.5.3.2. Estructura y dinámica de los estados disociados	146
III.5.3.3. Estructura y dinámica de todos los estados	150
III.5.3.3.1. Efecto del campo eléctrico en la estructura del citocromo c	153

III.5.3.4. Efecto del campo eléctrico en la disociación	155
III.5.3.4.1. Análisis termodinámico	156
III.5.4. Discusión	158
III.5.4.1. ¿Cómo actúa el campo eléctrico en la transición de coordinación? .	158
III.5.4.2. Implicaciones fisiológicas	159
III.5.5. Conclusiones	159
III.5.6. Bibliografía	161
 IV Conclusiones generales	 165
 IV.6. Conclusión final	 167
 V Apéndice	 171
 Agradecimientos	 177

I

Introducción general

I.1

Introducción

I.1.1. Definición y relaciones del campo eléctrico

Así como la masa de un cuerpo genera un campo gravitatorio que ejerce una fuerza sobre otra masa, análogamente, una partícula con carga eléctrica genera un campo eléctrico a su alrededor que afecta otras partículas cargadas aplicándoles una fuerza. A partir de la ley de Coulomb se deduce que una partícula de carga q_1 ubicada en la posición \vec{r}_0 produce un campo eléctrico (\vec{F}) en una dada posición del espacio (\vec{r}) relacionado por:

$$\vec{F} = \frac{1}{4\pi\epsilon} \frac{q_1}{|\vec{r} - \vec{r}_0|^3} (\vec{r} - \vec{r}_0) \quad (\text{I.1.1})$$

donde ϵ es la constante dieléctrica del medio. Al alejarse de la partícula, la magnitud del campo eléctrico decae de manera abrupta y no lineal (ecuación I.1.1). A su vez, este campo eléctrico producirá una fuerza \vec{f} sobre otra partícula de carga q_2 (ecuación I.1.2). Esta partícula se desplazará a una aceleración dada por la fuerza que ejerce el campo. Los sistemas de partículas con carga neta no nula tienden a trasladarse en presencia de un campo eléctrico.

$$\vec{f} = q_2 \cdot \vec{F} \quad (\text{I.1.2})$$

Es posible generar un campo eléctrico uniforme (del mismo valor en todos los puntos del espacio) a través de la aplicación de un potencial eléctrico entre dos placas conductoras paralelas separadas por un dieléctrico (un material no conductor de la corriente). A este sistema se lo conoce como capacitor. El campo eléctrico (F) dentro de este capacitor depende de la distancia (Δx) que separa las cargas positivas y negativas ubicadas en cada placa del capacitor que han sido desplazadas por la aplicación de una diferencia de potencial ($\Delta\varphi$) (ecuación I.1.3) [1].

$$F = -\frac{\Delta\varphi}{\Delta x} \quad (\text{I.1.3})$$

El campo eléctrico entre las placas es uniforme y perpendicular a las placas. El vector del campo apunta a la placa cargada negativamente desde la placa positiva (Figura I.1.1).

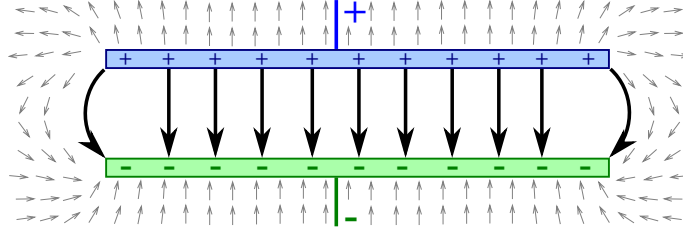


Figura I.1.1: Esquema del campo eléctrico en un capacitor de placas paralelas.

Se tiene un sistema de partículas cargadas cuya carga neta es nula. Las posiciones relativas entre las partículas permanecen invariantes por lo que el sistema como un todo sólo puede rotar y trasladarse pero no polarizarse. Dentro de un campo eléctrico homogéneo, la energía de este sistema quedará completamente determinada por su momento dipolar que permanece constante luego de la aplicación del campo, y se encuentra definido por la ecuación I.1.4.

$$\vec{\mu} = \sum_i q_i \vec{r}_i \quad (\text{I.1.4})$$

La energía dependerá del producto escalar entre el vector del momento dipolar y el vector del campo eléctrico según se expresa en la ecuación I.1.5.

$$E = -\vec{\mu} \cdot \vec{F} \quad (\text{I.1.5})$$

Esto indica que el campo eléctrico uniforme no tenderá a trasladar a este sistema de partículas (dado que su carga total es nula) pero sí tenderá a rotarlo de forma de alinear su dipolo eléctrico con el vector del campo de manera de disminuir la energía del sistema.

Cuando el campo eléctrico no es uniforme este puede interactuar con momentos superiores del sistema que se deducen de la expansión multipolar del potencial eléctrico [2]. Por ejemplo, el momento cuadrupolar de un sistema interactúa con el gradiente del campo eléctrico [1, 3, 4].

En general, para un sistema de partículas cargadas de carga neta nula, la mayor contribución a la interacción con un campo eléctrico no uniforme está dada por su momento dipolar, a excepción que su dipolo sea pequeño en comparación con sus momentos superiores. Por eso, muchas veces es suficiente describir al campo eléctrico de una compleja matriz espacial de distribuciones de cargas como un campo eléctrico medio uniforme. De esta manera, se puede

simplificar mucho el análisis de la interacción de una dada molécula dentro de un medio, con una compleja distribución de cargas, despreciando las interacciones de menor contribución.

La magnitud del campo eléctrico que se puede aplicar en un capacitor queda determinado por la diferencia de potencial aplicado y por la distancia de separación entre las placas (ecuación I.1.3). Hay un límite máximo en la aplicación del potencial dado que a potenciales muy elevados los electrones atraviesan el dieléctrico (incluso si éste es vacío) comportándose como un conductor. Por otra parte, hay un límite práctico en la generación de capacitores con una distancia de separación entre placas muy pequeña, y por lo tanto, hay un límite máximo en la intensidad del campo eléctrico que se puede aplicar en un capacitor. Sin embargo, en la cercanía de la superficie de electrodos sumergidos en soluciones conductoras (soluciones de electrolitos), los campos eléctricos que se pueden generar son mucho mayores. Aunque estos campos eléctricos no son uniformes en cualquier posición respecto de la superficie del electrodo, por lo que se determinan utilizando la ecuación I.1.6. Esta cuestión se ampliará más adelante.

$$F = -\frac{\partial\varphi}{\partial x} \quad (\text{I.1.6})$$

I.1.2. Reacciones químicas y campos eléctricos

Muchas reacciones biológicas ocurren en las proximidades o en el interior de las membranas lipídicas de las células (Figura I.1.2). Existe una diferencia en la electro-neutralidad entre ambos lados de la membrana que se encuentra controlada por la célula a través del bombeo de iones y por la apertura de canales selectivos de iones.

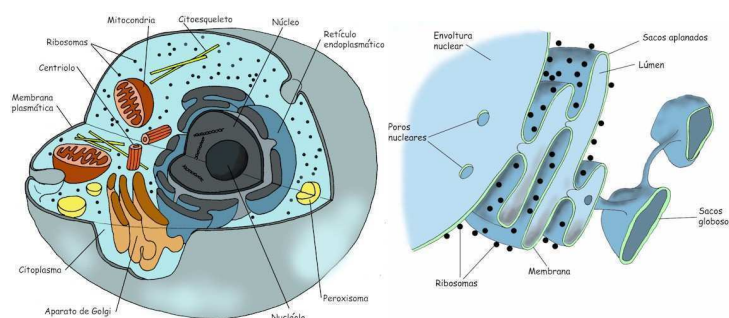


Figura I.1.2: Esquema de una célula animal (izquierda) y del sistema de membranas del retículo endoplasmático rugoso (derecha).

Esto produce una diferencia de potencial que genera un campo eléctrico importante en las proximidades y en el interior de la membrana (Figura I.1.3). Otros factores que contribuyen al potencial son el alineamiento de los dipolos dentro de la membrana y los componentes con

carga eléctrica en la interfaz membrana-solución. Para una membrana modelo totalmente saturada de fosfatidilcolina, la magnitud del campo eléctrico puede alcanzar valores de hasta 0.1 V \AA^{-1} [5].

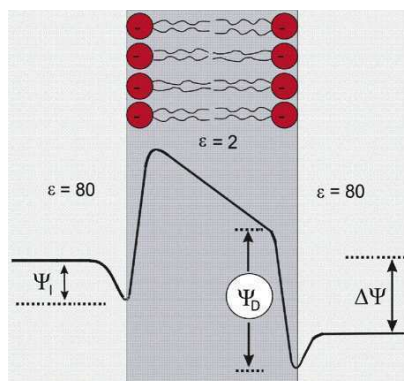


Figura I.1.3: Esquema de la distribución del potencial en una membrana.

Estos fuertes campos eléctricos pueden afectar la reactividad de las reacciones biológicas que ocurren en las proximidades de las membranas. De hecho, existe una familia de proteínas de membrana que funcionan como canales iónicos que son dependientes del potencial de membrana [6, 7]. Resulta de gran interés fisicoquímico comprender cómo actúan estas proteínas. Un escenario posible consiste en que el campo eléctrico perturbe la geometría de ciertos dominios produciendo la apertura de poros específicos de la proteína permitiendo así cumplir su función. Es esperable que un campo eléctrico pueda perturbar la geometría de un sistema tan grande y flexible como una proteína dado que ésta posee varios residuos polares y cargados eléctricamente capaces de interactuar con el campo. Pero, ¿puede el campo eléctrico afectar la reactividad de una reacción química? El campo eléctrico podría actuar perturbando los parámetros termodinámicos y cinéticos de dicha reacción [8, 9, 10].

El citocromo c y la citocromo c oxidasa son hemoproteínas de membrana transportadoras de electrones que se hallan en las mitocondrias de las células y sus estructuras se encuentran altamente conservadas en los organismos. ¿Puede ser posible que el campo eléctrico afecte la reactividad de estas hemoproteínas? ¿De qué forma actuaría? ¿Sobre el sitio activo (grupo hemo) o sobre la estructura global de la proteína? Estas son preguntas que se intentarán responder en esta tesis. Por otro lado, el estudio del efecto del campo eléctrico en la reactividad de porfirinas tiene una importancia aplicada dado que muchos dispositivos moleculares electrónicos utilizan porfirinas unidas a electrodos como, por ejemplo, ciertos sensores químicos [11].

I.1.3. Objetivos

En esta tesis se estudiará como puede afectar el campo eléctrico a las reacciones químicas que se producen en los sitios activos de estas hemoproteínas. Para ello, se estudiarán distintas reacciones que involucran porfirinas, como sistemas modelo de dichos grupos prostéticos, utilizando técnicas de simulación computacional y experimentales. Posteriormente, se intentará determinar la magnitud de los campos eléctricos en los sistemas experimentales estudiados. Finalmente, se evaluará cómo afecta el campo eléctrico a la proteína completa del citocromo c para discernir a qué nivel y cómo actúa.

I.1.4. Organización

Esta tesis está organizada en 4 partes que consisten en esta *Introducción general*, *Métodos generales*, *Desarrollo* y *Conclusiones generales*. La parte de *Desarrollo* está dividida en 5 capítulos del trabajo realizado utilizando variadas técnicas computacionales y experimentales. Cada uno de estos capítulos posee sus respectivas introducciones, métodos, resultados, discusiones y conclusiones particulares. En las *Conclusiones generales* se efectúa un balance global de todos los resultados obtenidos en la parte de *Desarrollo*. La bibliografía utilizada en cada parte/capítulo se ubica al final de cada uno de los mismos. Por último, se adjunta un *Apéndice* con material adicional que se encuentra mencionado adecuadamente en los capítulos.

I.1.5. Bibliografía

- [1] David Halliday, Robert Resnick, y Krane S. Kenneth. *FÍSICA*, volumen 2. Compañía Editorial Continental, México, 4th edition, 1995.
- [2] John David Jackson. *Classical Electrodynamics*. John Wiley and Sons, 3rd edition, 1999.
- [3] David J. Griffiths y Reed College. *Introduction to Electrodynamics*. Prentice-Hall, New Delhi, 1st edition, 2006.
- [4] Peter William Atkins. *Molecular Quantum Mechanics*. Oxford University Press, Oxford, 2nd edition, 1983.
- [5] R. J. Clarke. The dipole potential of phospholipid membranes and methods for its detection. *Advances in Colloid and Interface Science*, 89:263–281, 2001.
- [6] M. Yamakage y A. Namiki. Calcium channels—basic aspects of their structure, function and gene encoding; anesthetic action on the channels—a review. *Canadian Journal of Anaesthesia*, 49(2):151–164, 2002.
- [7] W. A. Catterall, E. Perez-Reyes, T. P. Snutch, y J. Striessnig. International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. *Pharmacological Reviews*, 57(4):411–425, 2005.
- [8] S. Shaik, S. P. de Visser, y D. Kumar. External electric field will control the selectivity of enzymatic-like bond activations. *Journal of the American Chemical Society*, 126:11746–11749, 2004.
- [9] H. Hirao, H. Chen, M. A. Carvajal, Y. Wang, y S. Shaik. Effect of External Electric Fields on the C-H Bond Activation Reactivity of Nonheme Iron-Oxo Reagents. *Journal of the American Chemical Society*, 130:3319–3327, 2008.
- [10] D. E. Bikiel, L. Boechi, L. Capece, A. Crespo, P. M. De Biase, S. Di Lella, M. C. Gonzalez Lebrero, M. A. Martí, A. D. Nadra, L. L. Perissinotti, D. A. Scherlis, y D. A. Estrin. Modeling heme proteins using atomistic simulations. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 8(48):5611–5628, 2006.
- [11] A. Gulino, P. Mineo, y I. Fragala. NO₂ sensing ability of monolayer of cobalt(II) porphyrin molecules covalently assembled on a engineered silica substrate. *Inorganica Chimica Acta*, 361(14–15):3877–3881, 2008.

II

Metodología general

II.1

Métodos experimentales

II.1.1. Aspectos generales

Solventes

Todos los solventes orgánicos fueron secados con los desecantes apropiados, destilados y almacenados protegiéndolos del oxígeno y de la luz. Los solventes más frecuentemente utilizados fueron agua, etanol, cloroformo, diclorometano. Se utilizó agua ultra pura (miliQ) libre de trazas de metales obtenida por ósmosis reversa y varios procesos de filtración con filtros para partículas, carbón activado, resinas de intercambio. El agua obtenida tiene una resistividad eléctrica de $18.2\text{ }M\Omega.cm^{-1}$.

II.1.2. Instrumentación

Las técnicas experimentales empleadas para el estudio experimental de esta tesis fueron:

1. *Espectroscopía UV-Visible*: es una espectroscopía que utiliza radiación electromagnética de las regiones visible, ultravioleta cercana (UV) e infrarroja cercana del espectro electromagnético. La radiación de esta región del espectro absorbida por las moléculas provoca transiciones electrónicas que pueden ser cuantificadas. Los espectros típicos que se obtienen con esta técnica representan la absorbancia medida a cada longitud de onda. La absorbancia de un compuesto (Abs) a cada longitud de onda (λ) se relaciona con su concentración molar (c), el camino óptico (l) y la absorptividad molar (ϵ) a cada longitud de onda a través de la ley de Lambert-Beer (ecuación II.1.1) que vale para absorbancias menores a uno.

$$Abs_{\lambda} = \epsilon_{\lambda} l c \quad (II.1.1)$$

2. *Espectroscopía de foto-electrones emitidos por rayos-X (XPS)*: es una espectroscopía semi-cuantitativa y de baja resolución espacial que habitualmente se utiliza para estimar la estequiometría (con un error del 10 % aproximadamente), estado químico y la estructura electrónica de los elementos que existen en un material o sobre una superficie. Los espectros XPS son obtenidos cuando una muestra es irradiada por rayos X (habitualmente el ánodo suele ser de Al o Mg) al tiempo que se mide la energía cinética y el número de electrones que escapan de la superficie del material analizado desde 1 a 10 nm de profundidad. Para una medición de XPS se requieren condiciones de ultra-alto vacío debido a que a presiones mayores la tasa de adsorción de contaminación sobre la muestra puede ser del orden de varias monocapas atómicas por segundo, impidiendo la medición de la superficie que realmente se quiere analizar [1].
3. *Microscopía de efecto túnel de barrido (STM)*: es una poderosa técnica para visualizar superficies al nivel atómico. STM sondea la densidad de estados de un material usando corriente eléctrica tuneleada¹. Para STM, 0.1 y 0.01 nm son consideradas buenas resoluciones lateral y de profundidad, respectivamente [2]. STM puede ser usado no sólo en ultra alto vacío sino también en aire, en varios líquidos y gases bajo temperaturas que van desde 0 Kelvin hasta algunos cientos de grados Celsius. El STM está basado en el concepto del tuneleo cuántico. Cuando una punta eléctricamente conductora se acerca demasiado a una superficie metálica o semiconductora, una diferencia de potencial entre ambos puede permitir que los electrones tuneleen a través del vacío que existe entre ellos [3]. Las variaciones en la corriente que se detecta a medida que la punta pasa por la superficie se transforma en una imagen. En este caso, se mantiene fija la distancia de separación entre la punta y la superficie. Otra manera de generar las imágenes consiste en variar la distancia entre la punta y la superficie de manera de mantener la corriente constante. En este caso, los valores de distancia se transforman en una imagen. Este último método fue el utilizado en esta tesis. La técnica de STM puede ser todo un desafío ya que requiere de superficies extremadamente limpias y puntas muy afiladas que terminen preferentemente en 1 átomo.
4. *Espectroscopía RAMAN*: El efecto Raman es una dispersión inelástica de un fotón. Cuando se hace incidir luz sobre un átomo o molécula, ésta dispersa la mayoría de los fotones elásticamente (Dispersión Rayleigh). Esto significa que los fotones dispersados tienen la misma frecuencia que los fotones incidentes. Sólo una pequeña fracción de la luz es dispersada ópticamente a frecuencias diferentes (aproximadamente 1 en 10^7 fotones), en general, mayoritariamente, esas frecuencias son inferiores que la de los

¹tunelear: atravesar el espacio vacío por efecto túnel

fotones incidentes. Esta diferencia en la frecuencia de la luz dispersada (dispersión Raman) corresponde a la energía de un cambio en los estados vibracionales, rotacionales o electrónicos de una molécula. La absorción de luz por parte de una molécula conduce al electrón a un estado superior de energía que al decaer emite un fotón. Cuando esto sucede existe la posibilidad de que ocurra lo siguiente:

- No exista intercambio de energía entre los fotones incidentes y las moléculas, y por lo tanto, no exista efecto Raman (Dispersión Elástica).
- Ocurran cambios de energía entre los fotones incidentes y las moléculas (Dispersión Inelástica). Las diferencias de energía son iguales a las diferencias de los estados vibracionales o rotacionales de la molécula.
 - Las moléculas absorben la energía: a esto se le denomina dispersión Stokes. El fotón resultante es de inferior frecuencia y genera una línea de Stokes en el lado rojo del espectro incidente.
 - La molécula pierde energía: dispersión anti-Stokes. Los fotones incidentes son desplazados a frecuencias más elevadas (azul) del espectro, y generan por lo tanto una línea que se denomina anti-Stokes.

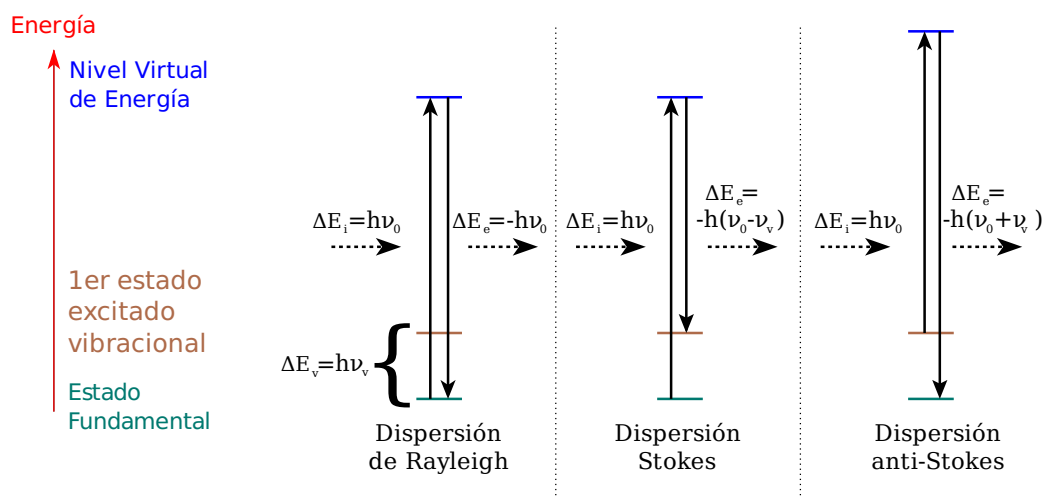


Figura II.1.1: Las diferentes posibilidades de la dispersión de un fotón: dispersión de Rayleigh (sin efecto Raman), la dispersión Stokes (la molécula absorbe energía) y la dispersión anti-Stokes (molécula pierde energía)

El espectro Raman se obtiene luego de sustraerle a las frecuencias medidas, las frecuencia de la luz monocromática del láser utilizado. Estas diferencias corresponderán a las frecuencias de los modos vibracionales y rotacionales de las moléculas que dispersaron la luz. El espectro Raman completo (incluyendo las bandas Stokes y anti-Stokes)

es simétrico respecto de la banda de Rayleigh. Lo que varían son las intensidades de las bandas que dependen del número de moléculas que ocupan los diferentes estados vibracionales cuando el proceso comienza, lo que significa que dependerán de la temperatura inicial de las moléculas. La distribución de Boltzmann condiciona el número de moléculas en los estados inferiores, por lo tanto, a temperaturas relativamente bajas el espectro de Stokes es más intenso que el espectro de anti-Stokes.

Una transición Raman desde un estado hacia otro puede ser activado ópticamente sólo en casos en que la derivada de la polarizabilidad (α) es no nula con respecto a la coordenada normal (Q) de la rotación o vibración ($\left|\frac{\partial\alpha}{\partial Q}\right| > 0$). Así como la intensidad (I) de un modo normal de vibración activa en el IR es proporcional a $I_{IR} \sim \left(\frac{\partial\mu}{\partial Q}\right)^2$, siendo μ el momento dipolar permanente, en el Raman es proporcional a $I_{RAMAN} \sim \left(\frac{\partial\alpha}{\partial Q}\right)^2$ [4].

5. *Espectroscopía RAMAN RESONANTE*: En esta espectroscopía Raman, la longitud de onda de excitación coincide con una transición electrónica de la molécula, eso conlleva a que los modos vibracionales asociados con el estado electrónico excitado son enormemente amplificados. Las principales diferencias con la dispersión Raman normal es que nos confiere una alta sensibilidad otorgándonos un factor de amplificación respecto del Raman normal de alrededor de un millón, por lo que, las concentraciones de trabajo mínima que se puede utilizar es de 10^{-8} M con respecto a los 0.1 M del Raman clásico. Otra importante ventaja es que nos otorga una alta especificidad, permitiéndonos intensificar diferencialmente los modos normales del grupo funcional asociado a la transición electrónica de la molécula que se desea observar.

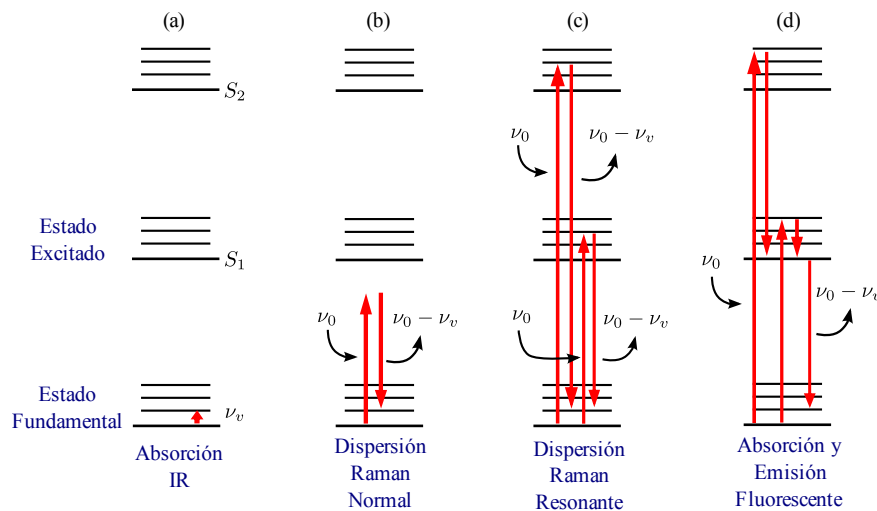


Figura II.1.2: Comparación de las transiciones entre niveles energéticos de Absorción IR, Raman, Raman Resonante y Fluorescencia.

Algunos problemas son que se necesita un láser con una longitud de onda adecuada para obtener máxima amplificación resonante, hay un alto riesgo de tener interferencias por fluorescencia y aumentan las probabilidades de la fotodegradación de la muestra. La Figura II.1.2 nos muestra un esquema de las transiciones de los niveles energéticos comparando distintas técnicas espectroscópicas: Absorción IR, Raman clásico, Raman Resonante y Fluorescencia [5].

6. *Dispersión Raman Amplificada por Superficies (SERS) y Dispersión Raman Resonante Amplificada por Superficies (SERRS)*: El efecto SERS se observa normalmente en moléculas cercanas o adsorbidas a nanopartículas de plata u oro ópticamente activas debido a la Resonancia de los Plasmones Superficiales. Los plasmones superficiales de la plata y el oro son excitados por el láser, lo que resulta en un incremento en los campos eléctricos alrededor del metal y dado que las intensidades Raman son proporcionales a los campos eléctricos existe un importante aumento en la señal medida de hasta 10^6 veces. Existen dos mecanismos que producen esta amplificación: Electromagnético: es el efecto dominante, y Químico: debido a uniones químicas con el metal, el adsorbato incrementa su polarizabilidad. La superficie del metal deber ser rugosa (poseer nanopartículas del tamaño adecuado) para ser ópticamente activa. Una importante característica de esta espectroscopía es que el metal apaga totalmente la fluorescencia del adsorbato a través de un decaimiento no radiativo de su energía. El SERRS es esencialmente el SERS en condiciones de Resonancia del adsorbato. Posee una alta especificidad y muy alta sensibilidad con una amplificación de 10^{12} veces. La intensidad es máxima cuando los plasmones resuenan a la misma frecuencia que la frecuencia de excitación de la molécula adsorbida y además está quimioadsorbida. En la Figura II.1.3 se muestra un esquema de un dispositivo utilizado para realizar mediciones espectroscópicas haciendo uso de estas técnicas. El haz del láser pasa a través de un filtro que deja pasar sólo la luz con la longitud de onda del láser. Este pasa a través de un espejo semitransparente y luego por una lente que enfoca el haz sobre un electrodo rugoso rotatorio que tiene la muestra adsorbida. La rotación del electrodo disminuye el tiempo de exposición del láser sobre la muestra para evitar la fotodegradación. La luz dispersada ahora se refleja en el espejo semitransparente y pasa a través de un filtro *notch* que filtra la longitud de onda del láser de forma de eliminar la luz de la reflexión y dispersión elástica del láser sobre el electrodo y la muestra. El haz luego es analizado por un espectrómetro que envía a la computadora los datos de la intensidad de luz medida a cada longitud de onda obteniendo de esta forma un espectro Raman [6].

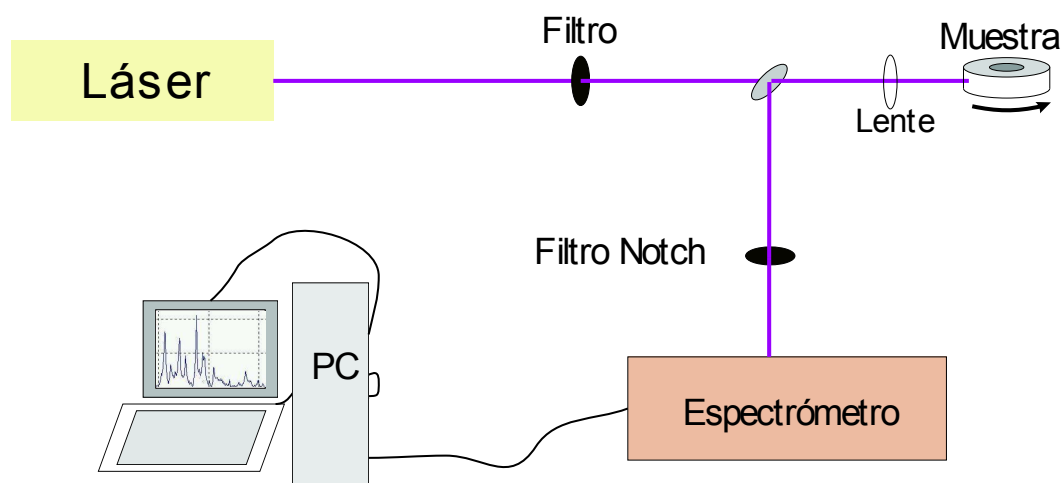


Figura II.1.3: Esquema de un dispositivo utilizado para la medición con la técnica SERS.

7. Técnicas Electroquímicas: Amperometría de potencial continuo y Voltametrías Cíclicas.

La amperometría de potencial continuo consiste en la aplicación de un potencial constante y en la medición simultánea de corriente. En la voltametría cíclica se aplica una rampa de potencial (E) en función del tiempo sobre el electrodo de trabajo y simultáneamente se mide la corriente (i) resultante. La corriente medida es proporcional a la velocidad de barrido (v) y a la capacidad diferencial (C) dada por la ecuación II.1.2, por lo que se obtendrá una corriente negativa con una velocidad de barrido negativa y viceversa.

$$i = vC \quad (\text{II.1.2})$$

Esto se deduce de la definición de capacidad diferencial (ecuación II.1.3).

$$C = \frac{\partial q}{\partial E} = \frac{\frac{\partial q}{\partial t}}{\frac{\partial E}{\partial t}} = \frac{i}{v} \quad (\text{II.1.3})$$

En esta tesis se han realizado experimentos empleando ya sea la técnica 6 y la técnica 7 por separado, como así también experimentos en los que ambas técnicas se usaron simultáneamente.

Equipamiento utilizado

Los espectros UV-Visible fueron tomados en un espectrómetro Hewlett Packard 8453 con arreglo de diodos empleando una celda de cuarzo de 1 cm de camino óptico.

Los potenciostatos utilizados fueron un PAR 273A y un TEQ-03. Se utilizó para determinar la capacidad diferencial un LOCK-IN Amplifier PAR 5210.

Los espectros SERRS se midieron en una geometría de dispersión reversa usando un microscopio confocal acoplado a un espectrógrafo de plataforma simple (Jobin Yvon, XY-800) equipado con una rejilla con 1800 o 1200 rendijas por milímetro y un detector CCD con un sistema de refrigeración de nitrógeno líquido. La dispersión elástica fue eliminada utilizando un filtro Notch. Se enfocó un haz de 413 nm de un láser continuo de Kriptón iónico (Coherent Innova 300c) en la superficie del electrodo de Ag rotatorio a través de un objetivo de larga distancia de trabajo (20x; N.A. 0.35) (Figura II.1.3).

La descripción detallada y específica de la metodología de trabajo se presentan en los capítulos correspondientes.

II.1.3. Tratamiento de datos mediante descomposición de valores singulares

La descomposición de valores singulares (SVD) es una poderosa técnica matemática que se utiliza en el cómputo y análisis de matrices. SVD se utiliza en el procesamiento de señales, estadística, el ajuste de datos con cuadrados mínimos, reducción de ruido, determinación de pseudo-inversas y el rango de matrices.

Cualquier matriz A de dimensión $M \times N$ siendo $M \geq N$ puede factorizarse de la forma:

$$A = U\Sigma V^T \quad (\text{II.1.4})$$

donde U es una matriz ortonormal de dimensión $M \times M$ llamada *hanger*, V es una matriz ortonormal de dimensión $N \times N$ llamada *aligner*, y Σ es una matriz diagonal llamada *stretcher* de $N \times N$ donde todos sus elementos diagonales son mayores o iguales a cero y están ordenados en forma decreciente.²

Es posible encontrar las matrices U , Σ , V de la siguiente forma:

$$M = A^T A = (V^T)^T \Sigma^T U^T U \Sigma V^T \quad (\text{II.1.5})$$

Al ser U una matriz ortonormal por lo cual $U^T U = I$ (siendo I la matriz identidad de $N \times N$) se obtiene que:

$$M = V \Sigma^2 V^T \quad (\text{II.1.6})$$

lo cual es un sistema de ecuaciones de autovalores y autovectores. Por lo tanto, el problema de encontrar las matrices de la descomposición de valores singulares de la matriz A se reduce

²Si bien es posible obtener un grupo de matrices $U\Sigma V^T$ de distintas dimensiones, la que se muestra fue la convención que se utilizó en este trabajo de tesis.

a diagonalizar la matriz M y encontrar sus autovalores y autovectores. Una vez hecho esto los valores de la diagonal de Σ se obtienen a partir de la raíz cuadrada positiva de los autovalores de M , V se construye con los autovectores de estos y U se obtiene multiplicando a la ecuación II.1.4 por $V\Sigma^{-1}$:

$$U = AV\Sigma^{-1} = U\Sigma V^T V\Sigma^{-1} \quad (\text{II.1.7})$$

donde Σ^{-1} es una matriz diagonal que tiene como elementos de su diagonal la inversa de los elementos diagonales de Σ , por lo que $\Sigma\Sigma^{-1} = I$.

A modo de ejemplo, se puede suponer que la matriz A contiene datos obtenidos por alguna técnica espectroscópica como podría ser la intensidad detectada a cada longitud de onda a medida que se varía la concentración de un reactivo. Los datos de la intensidad se encuentran en cada columna, o sea, que cada fila corresponde a una longitud de onda determinada y cada columna a un espectro medido a una dada concentración de reactivo. Se supondrá que, los espectros medidos son una combinación lineal de cada uno de los espectros individuales de cada una de las especies detectables con dicha técnica, como pueden ser, los reactivos, intermediarios y productos. Se quiere determinar los espectros de las especies detectables y la cantidad relativa de cada una de ellas en cada medición, para ello, se realiza una descomposición SVD de dicha matriz obteniendo las matrices en II.1.4. Por combinación lineal de los vectores de las columnas de U , se obtiene cada uno de los espectros medidos, y además, cada uno de los espectros individuales de las especies detectables. Por otra parte, el valor de los elementos de la diagonal de Σ brinda información acerca de la contribución de cada uno de los vectores de U en los espectros medidos, entonces, al estar estos elementos ordenados en orden decreciente indican que el primer vector es el de mayor contribución a los espectros, el segundo es el siguiente y así sucesivamente. Estos valores caen en forma similar a una función exponencial decreciente. Si se grafican estos vectores se observa que los primeros espectros tienen formas similares a los espectros medidos (pero no necesariamente iguales) y los últimos tendrán formas más estocásticas. Estos últimos vectores corresponden al ruido de la medición y no suelen ser componentes reproducibles de los espectros. De esta forma se pueden llegar a identificar la cantidad de vectores mínimos que pueden componer los espectros medidos y componer de nuevo la matriz de datos sólo con los n componentes principales de los espectros, eliminando de esta manera el ruido instrumental. Para llevar a cabo esto, se acortan las matrices eliminando las columnas correspondientes a los vectores secundarios de U , quedándose con el cuadrante superior de Σ que contiene los primeros n elementos y eliminando las correspondientes filas de V . De esta forma se obtiene:

$$A \simeq A' = U_c \Sigma_c V_c^T \quad (\text{II.1.8})$$

Para simplificar el análisis se define a

$$B = U_c \Sigma_c \quad (\text{II.1.9})$$

reescribiendo

$$A' = B V_c^T \quad (\text{II.1.10})$$

Por lo cual, B contiene ahora los vectores principales de U pesados por los elementos diagonales principales de Σ . Entonces V^T contiene en sus filas los coeficientes con los cuales por combinación lineal de los vectores columna de B se obtienen cada uno de los espectros medidos sin ruido de A' . Pero ni los vectores columna de B son los espectros detectables, ni los vectores filas de V^T son las cantidades relativas de los espectros detectables. Para hallar lo buscado se debe definir a la matriz rotacional R que es una matriz de $n \times n$ inversible por lo cual $RR^{-1} = I$. Podemos insertar la matriz identidad en medio de II.1.10 obteniendo:

$$A' = B R R^{-1} V_c^T \quad (\text{II.1.11})$$

Definiendo a $E = BR$ y $C = R^{-1} V_c^T$ se reescribe:

$$A' = EC \quad (\text{II.1.12})$$

Resta encontrar R inversible tal que transforme a B en la matriz E que contiene en sus columnas los espectros individuales de las especies detectables y que su inversa (R^{-1}) transforme a V_c^T en la matriz que contiene las cantidades relativas de cada una de las especies detectables. Posteriormente, se explicará como encontrar R de forma tal de transformar B y V_c^T en las matrices que contienen la información que se busca.

La ventaja de este procedimiento es que es posible utilizar todos los espectros completos para hacer el análisis de datos, por lo cual, se tiene mucho más información estadística que permite extraer el ruido, y obtener con alta resolución los espectros de las especies involucradas y las cantidades relativas de las mismas de manera confiable.

En esta tesis, este procedimiento se utilizó en el análisis de datos de los espectros obtenidos por técnicas de UV y Raman para la determinación de constantes de equilibrio.

II.2

Métodos computacionales

Durante las últimas décadas, el área de simulación computacional en química ha recibido un impulso tal, que se ha convertido en una herramienta irremplazable para el estudio de una variedad de fenómenos químicos. La combinación de elementos matemáticos y computacionales con las leyes fundamentales de la física permite abordar el estudio de procesos de relevancia química desde un punto de vista microscópico.

La selección del nivel de teoría adecuado para estudiar un determinado problema, y la evaluación de la calidad de los resultados obtenidos son dos de las tareas más complicadas dentro del trabajo de un químico computacional. Antes de llevar a cabo cualquier estudio, se deben tener presentes tanto las posibilidades como las limitaciones de los modelos y métodos a utilizar, ya que una aplicación inapropiada de los mismos puede conducir a resultados carentes de sentido. Sin embargo, cuando se emplea adecuadamente, constituye una herramienta muy valiosa en el análisis e interpretación de resultados experimentales, e incluso en la determinación de propiedades moleculares de las que no se dispone de valores empíricos.

Según el problema seleccionado y el nivel de descripción que se requiera podemos mencionar distintos tipos de modelos:

- *Modelos basados en la química cuántica.* A partir de las leyes de la mecánica cuántica, es posible determinar la estructura de las moléculas, calcular propiedades espectroscópicas, estudiar procesos reactivos, comprender el mecanismo de reacciones químicas, caracterizar productos, etc. Pueden ser utilizados como herramienta predictiva, por ejemplo permiten "experimentar" con una sustancia, conocer muchas de sus propiedades sin necesidad de sintetizarla, de modo que se puede orientar a un investigador experimental sobre qué molécula va a tener las características deseables. De este modo, sólo se sintetiza y analiza aquella que tenga las propiedades que más le interese, ahorrándole tiempo y dinero.
- *Modelos clásicos.* El modelado de fenómenos que no involucren formación o ruptura de

enlaces químicos, es decir aquellos procesos donde la estructura electrónica no cambia considerablemente, pueden ser descriptos por modelos más simples que captan adecuadamente la esencia del problema de estudio haciendo innecesario el uso de modelos más complejos. En estos modelos las moléculas (o átomos) pueden ser representadas por masas puntuales, generalmente provistas de carga, que interactúan a través de un potencial de interacción parametrizado adecuadamente conocido como campo de fuerzas clásicos.

II.2.1. Modelos basados en la mecánica cuántica

II.2.1.1. Mecánica cuántica

La mecánica que rige el comportamiento de partículas pequeñas (como los electrones) es la llamada mecánica cuántica, desarrollada a principios del siglo pasado a partir de contribuciones de Bohr, Einstein, Dirac, Planck, Heisenberg y Schrödinger, entre otros [7]. Para describir el estado de un sistema en mecánica cuántica, se postula la existencia de una función de las coordenadas de las partículas y del tiempo, Ψ , llamada función de onda o función de estado. La función de onda contiene toda la información que es posible conocer acerca del sistema. Dentro de una aproximación no relativista, Ψ se obtiene de la resolución de la ecuación de Schrödinger dependiente del tiempo. Para un sistema de n partículas con coordenadas r_i y masas m_i :

$$i\hbar \frac{\partial \Psi(r_1, \dots, r_n, t)}{\partial t} = -\frac{\hbar^2}{2} \left(\frac{\nabla_1^2}{m_1} + \dots + \frac{\nabla_n^2}{m_n} \right) \Psi(r_1, \dots, r_n, t) + V(r_1, \dots, r_n, t) \Psi(r_1, \dots, r_n, t) \quad (\text{II.2.1})$$

Si la función de energía potencial del sistema no depende del tiempo, se puede separar la parte temporal de la espacial, entonces el sistema puede estar en uno de sus estados estacionarios de energía constante. Dichos estados estacionarios se obtienen resolviendo la ecuación de Schrödinger no relativista e independiente del tiempo:

$$-\frac{\hbar^2}{2} \left(\frac{\nabla_1^2}{m_1} + \dots + \frac{\nabla_n^2}{m_n} \right) \Psi(r_1, \dots, r_n) + V(r_1, \dots, r_n) \Psi(r_1, \dots, r_n) = E \Psi(r_1, \dots, r_n) \quad (\text{II.2.2})$$

Si se define el operador Hamiltoniano como:

$$\hat{H} = -\frac{\hbar^2}{2} \left(\frac{\nabla_1^2}{m_1} + \dots + \frac{\nabla_n^2}{m_n} \right) + V(r_1, \dots, r_n) \quad (\text{II.2.3})$$

ahora la ecuación II.2.2 se puede escribir como $\hat{H}\Psi(r_1, \dots, r_n) = E\Psi(r_1, \dots, r_n)$, que es la forma más comúnmente utilizada. El Hamiltoniano molecular presentado en la ecuación II.2.4 (en unidades atómicas) contiene términos de movimiento y atracción/repulsión entre las diferentes partículas. Tal como se puede observar en la ecuación II.2.4, se incluyen términos asociados a la energía cinética de los núcleos y de los electrones, atracción entre núcleos y electrones, repulsión entre electrones y repulsión entre núcleos.

$$\hat{H} = -\sum_{i=1}^N \frac{1}{2} \nabla_i^2 - \sum_{A=1}^M \frac{1}{2M_A} \nabla_A^2 - \sum_{i=1}^N \sum_{A=1}^M \frac{Z_A}{r_{iA}} + \sum_{i=1}^N \sum_{j>i}^N \frac{1}{r_{ij}} + \sum_{A=1}^M \sum_{B>A}^M \frac{Z_A Z_B}{R_{AB}} \quad (\text{II.2.4})$$

La ecuación II.2.4 sólo puede resolverse exactamente para sistemas de dos partículas, por lo que resulta necesario el uso de aproximaciones para sistemas mayores. Una aproximación que resulta sumamente útil para reducir la complejidad del cálculo es la llamada aproximación de *Born-Oppenheimer* [7, 8]. Esta aproximación se basa en que la masa de los núcleos es miles de veces mayor que la de los electrones y éstos se mueven, por lo tanto, mucho más lentamente. Así el movimiento electrónico puede describirse en el campo creado por los núcleos fijos. Entonces, el movimiento de los electrones está desacoplado del movimiento de los núcleos y por ende, se puede decir que los electrones se acomodan instantáneamente a una dada disposición de los núcleos. De modo que, es lícito escribir una función de onda electrónica para cada geometría nuclear siendo ahora el último término de la ecuación II.2.4 una constante.

Mediante el uso de la aproximación de Born-Oppenheimer, hemos simplificado la ecuación de Schrödinger. Sin embargo, la ecuación continúa siendo irresoluble de forma exacta para sistemas de más de un electrón debido al término de repulsión interelectrónica, por lo que deben hacerse aproximaciones adicionales. Existen diversos métodos, caracterizados por el distinto nivel de aproximación matemática. Una de las clasificaciones más empleadas es la que distingue entre métodos semi-empíricos, métodos *ab-initio* y el método del funcional de la densidad (DFT). A su vez, en función de la estrategia utilizada para resolver las ecuaciones, estos métodos se clasifican como variacionales o perturbacionales. Antes de pasar a los métodos veamos brevemente qué dice el teorema variacional y la teoría de perturbaciones.

II.2.1.1.1. Teorema variacional

El valor medio de la energía asociada a una función de onda aproximada o de prueba, Φ , se puede calcular como:

$$W = \frac{\int \Phi^* \hat{H} \Phi d\tau}{\int \Phi^* \Phi d\tau} = \frac{\langle \Phi | \hat{H} | \Phi \rangle}{\langle \Phi | \Phi \rangle} \quad (\text{II.2.5})$$

El teorema variacional enuncia que si la función de onda de prueba cumple las condiciones de contorno del problema, se cumple la siguiente desigualdad:

$$W = \frac{\langle \Phi | \hat{H} | \Phi \rangle}{\langle \Phi | \Phi \rangle} \geq E_0 \quad (\text{II.2.6})$$

donde E_0 es la energía correspondiente al estado fundamental. Esta desigualdad resulta extremadamente útil ya que proporciona un criterio para evaluar la calidad de una función de onda de prueba, cuanto menor sea la energía asociada, mejor será la función de prueba. Esto permite proponer como estrategia para encontrar soluciones aproximadas de la ecuación II.2.4, la búsqueda de aquellas funciones que minimicen la energía del sistema [7, 8].

II.2.1.1.2. Teoría de perturbaciones

La base de esta teoría consiste en separar el problema en una parte resoluble de forma exacta y una parte complicada para la que no existe solución analítica. Se divide el Hamiltoniano electrónico en dos partes, se supone que estos Hamiltonianos no son muy diferentes y por ende, la energía y la función de onda tampoco lo será. Si describimos la perturbación como:

$$\hat{H}' \equiv \hat{H} - \hat{H}^0 \quad (\text{II.2.7})$$

$$\hat{H} \equiv \hat{H}^0 + \lambda \hat{H}' \quad (\text{II.2.8})$$

$$\hat{H} \Psi_n = (\hat{H}^0 + \lambda \hat{H}') \Psi_n = E \Psi_n \quad (\text{II.2.9})$$

donde el subíndice n se refiere al nivel energético. En este contexto es posible considerar a la función de onda y la energía como funciones del parámetro λ , tal que $\Psi_n |_{\lambda=0} = \Psi_n^0$ y $E_n |_{\lambda=0} = E_n^0$. En este caso se puede expandir como series de Taylor:

$$\Psi_n = \Psi_n |_{\lambda=0} + \frac{\partial \Psi_n}{\partial \lambda} |_{\lambda=0} \lambda + \frac{\partial^2 \Psi_n}{\partial^2 \lambda} |_{\lambda=0} \frac{\lambda^2}{2!} + \dots \quad (\text{II.2.10})$$

$$E_n = E_n |_{\lambda=0} + \frac{\partial E_n}{\partial \lambda} |_{\lambda=0} \lambda + \frac{\partial^2 E_n}{\partial^2 \lambda} |_{\lambda=0} \frac{\lambda^2}{2!} + \dots \quad (\text{II.2.11})$$

Acotando al segundo orden y definiendo la condición de normalización: $\langle \Psi_n^0 | \Psi_n^0 \rangle = 1$,

queda:

$$E_n \approx E_n^0 + \langle \Psi_n^0 | \hat{H}' | \Psi_n^0 \rangle + \sum_{m \neq n} \frac{|\langle \Psi_n^0 | \hat{H}' | \Psi_m^0 \rangle|^2}{(E_n^0 - E_m^0)} \quad (\text{II.2.12})$$

El problema se reduce entonces a encontrar los coeficientes de la expansión. Si la perturbación es pequeña, entonces alcanzará con los primeros términos de dicha expansión.

Habiendo presentado estas dos formas de resolver en forma aproximada la ecuación II.2.2, posteriormente veremos en que consisten los métodos *ab-initio* y DFT [7, 8].

II.2.1.2. Métodos *ab-initio*

El término *ab-initio* (o primeros principios) hace referencia a que los cálculos están basados únicamente en las leyes de la mecánica cuántica y no emplean datos experimentales que no sean los valores de las constantes físicas fundamentales. Son métodos que resuelven la ecuación de Schrödinger haciendo uso de una serie de aproximaciones matemáticas rigurosas. Como ya hemos mencionado anteriormente, el término de repulsión interelectrónica es el responsable de que la ecuación II.2.4 no puede resolverse exactamente en sistemas de más de un electrón. La primera aproximación importante se introdujo de la mano de la teoría de **Hartree-Fock (HF)** [7, 8], en la que la función de onda se aproxima a un producto antisimetrizado de funciones monoeléctricas, es decir, se considera el movimiento de cada electrón en forma independiente. Esta aproximación es conocida con el nombre de "*aproximación orbital*".

$$\Phi = \chi_1(r_1)\chi_2(r_2)\dots\chi_N(r_N) \quad (\text{II.2.13})$$

Donde las χ son funciones espín-orbitales unielectricas y r representa las coordenadas espaciales para cada electrón. Esta función debe poseer una propiedad fundamental para cualquier función de onda electrónica, y esto es, que debe ser antisimétrica respecto a la permutación de un par de electrones (*principio de exclusión de Pauli*). Este requerimiento se satisface fácilmente escribiendo el producto como *determinante de Slater*, definido de la siguiente forma:

$$\Phi = \chi_1(r_1)\chi_2(r_2)\dots\chi_N(r_N) = \frac{1}{\sqrt{N!}} \begin{vmatrix} \chi_i(r_1) & \chi_j(r_1) & \cdots & \chi_k(r_1) \\ \chi_i(r_2) & \chi_j(r_2) & \cdots & \chi_k(r_2) \\ \vdots & \vdots & & \vdots \\ \vdots & \vdots & & \vdots \\ \chi_i(r_{1N}) & \chi_j(r_{1N}) & \cdots & \chi_k(r_N) \end{vmatrix} \quad (\text{II.2.14})$$

Así, permutar dos electrones es equivalente a permutar dos columnas, lo que según las propiedades de los determinantes, le cambia el signo, satisfaciendo así el principio de Pauli.

En esta aproximación, usando el Hamiltoniano electrónico y empleando una función de onda del tipo determinante de Slater la expresión para la energía queda:

$$E = \langle \Psi | \hat{H}_{el} | \Psi \rangle = \sum_{i=1}^N H_{ii}^{core} + \frac{1}{2} \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N (J_{ij} - K_{ij}) \quad (\text{II.2.15})$$

En esta expresión, H_{ii}^{core} es un Hamiltoniano reducido que depende de las coordenadas de un sólo electrón. J_{ij} y K_{ij} son las integrales de Coulomb y de intercambio que dependen de las coordenadas de dos electrones. La primera representa la repulsión electrostática entre los electrones y la segunda es consecuencia del principio de exclusión de Pauli y no encuentra analogía en la física clásica.

$$H_{ii}^{core} \equiv -\frac{1}{2} \langle \chi_i(r_1) | \nabla_1^2 | \chi_i(r_1) \rangle - \left\langle \chi_i(r_1) \left| \sum_A \frac{Z_A}{r_{1A}} \right| \chi_i(r_1) \right\rangle \quad (\text{II.2.16})$$

$$J_{ij} \equiv \langle \chi_i(r_1)\chi_j(r_2) | r_{12}^{-1} | \chi_i(r_1)\chi_j(r_2) \rangle \quad (\text{II.2.17})$$

$$K_{ij} \equiv \langle \chi_i(r_1)\chi_j(r_2) | r_{12}^{-1} | \chi_j(r_1)\chi_i(r_2) \rangle \quad (\text{II.2.18})$$

Luego, mediante el uso del *teorema variacional* se encuentran aquellos orbitales que minimizan la energía en la ecuación II.2.15, y de esta forma se llega a una ecuación de autovalores para los orbitales conocida como ecuación de Hartree-Fock:

$$\hat{F}(r_1) | \chi_i(r_1) \rangle = \sum_{j=1}^N \varepsilon_{ij} | \chi_j(r_1) \rangle \quad (\text{II.2.19})$$

Donde los ε_{ij} son los multiplicadores indeterminados de Lagrange asociados a los N espín orbitales χ_i , denominados orbitales moleculares de Hartree-Fock, y \hat{F} es el operador de Fock, el que se define del modo siguiente:

$$\hat{F}(r_1) = \hat{H}_{ii}^{core}(r_1) + \sum_{j=1}^N \left[\hat{J}_j(r_1) - \hat{K}_j(r_1) \right] \quad (\text{II.2.20})$$

Los operadores \hat{H}_{ii}^{core} , \hat{J}_j y \hat{K}_j se definen según su acción en un orbital determinado,

$$\hat{H}_{ii}^{core}(r_1)\chi_i(r_1) \equiv -\frac{1}{2}\nabla_1^2\chi_i(r_1) - \sum_A \frac{Z_A}{r_{1A}}\chi_i(r_1) \quad (\text{II.2.21})$$

$$\hat{J}_{ij}(r_1)\chi_i(r_1) \equiv \left[\int dr_2 \chi_j^*(r_2) r_{12}^{-1} \chi_j(r_2) \right] \chi_i(r_1) \quad (\text{II.2.22})$$

$$\hat{K}_{ij}(r_1)\chi_i(r_1) \equiv \left[\int dr_2 \chi_j^*(r_2) r_{12}^{-1} \chi_i(r_2) \right] \chi_j(r_1) \quad (\text{II.2.23})$$

El primero opera sobre las coordenadas de un sólo electrón, en cambio el segundo y tercero, llamados Coulomb e intercambio respectivamente, involucran coordenadas de dos electrones. El operador de Coulomb da la repulsión electrostática efectiva (o promediada) del electrón i producida por el electrón j . Es posible diagonalizar la matriz de los multiplicadores de Lagrange mediante una transformación unitaria que no altera el operador de Fock ni el valor del determinante de Slater, el que representa la función de onda total. Luego de aplicada dicha transformación la ecuación de Hartree-Fock queda:

$$\hat{F}(r_1) |\chi_i(r_1)\rangle = \varepsilon_i |\chi_i(r_1)\rangle \quad (\text{II.2.24})$$

Donde las autofunciones $\chi_i(r_1)$ son los espín-orbitales canónicos, cuyas energías están dadas por los autovalores ε_i . Debido a que las soluciones de estas ecuaciones dependen de las funciones que se desea obtener, y éstas a su vez, dependen del operador de Fock, la resolución de las mismas se lleva a cabo utilizando un método iterativo denominado método del campo autoconsistente o SCF. Este método arroja como resultado un conjunto de orbitales atómicos/moleculares y energías orbitales.

El método HF implica la resolución iterativa de un sistema de ecuaciones que entraña gran dificultad, de manera que sólo es factible para átomos y moléculas diatómicas. Para sistemas mayores es necesario introducir una nueva aproximación, propuesta en 1951 por C.C.J.Roothaan y G.G.Hall, que consiste en expresar los orbitales moleculares como una combinación lineal de funciones base.

$$|\chi_i\rangle = \sum_{k=1}^L C_{ki} |\Phi_k\rangle \quad (\text{II.2.25})$$

El problema ahora se reduce a obtener la matriz de coeficientes que minimicen la ener-

gía. Reescribiendo la ecuación de Hartree-Fock en esta base finita se obtienen las llamadas *ecuaciones de Roothaan*.

$$\sum_{k=1}^L C_{ki} \left(\langle \Phi_\nu | \hat{F} | \Phi_k \rangle - \varepsilon_i \langle \Phi_\nu | \Phi_k \rangle \right) = 0 \quad (\text{II.2.26})$$

Si definimos la matriz F cuyos elementos están dados por $F_{k\nu} \equiv \langle \Phi_\nu | \hat{F} | \Phi_k \rangle$ y la matriz S con elementos según $S_{k\nu} = \langle \Phi_\nu | \Phi_k \rangle$, las ecuaciones de Roothaan pueden reescribirse de la siguiente forma:

$$FC = SC\varepsilon \quad (\text{II.2.27})$$

En esta ecuación C es la matriz de los coeficientes, ε es la matriz diagonal de las energías orbitales. Conociendo la matriz F , se puede calcular la matriz de coeficientes y la energía a través de la ecuación secular:

$$\det(F - \varepsilon S) = 0 \quad (\text{II.2.28})$$

Aquí F depende de los coeficientes, por lo que el problema se resuelve iterativamente, para esto se propone inicialmente una matriz de coeficientes, se calcula F , se obtienen nuevos coeficientes los que dan una nueva F , y se repite el procedimiento hasta que la matriz de coeficientes que se obtiene es esencialmente igual a la del paso precedente. De esta forma proceden los programas que utilizan el método HF.

Este método tiene sus limitaciones, una de ellas tiene que ver con la capacidad de la base de representar a los orbitales, cuanto mejor sea la calidad de la base, mejor serán los valores de energía obtenidos. La otra limitación tiene que ver con la correlación electrónica. Los electrones se repelen y tienden a alejarse unos de otros. Los movimientos de los mismos están pues correlacionados entre sí, de modo que la probabilidad de encontrar dos electrones en el mismo punto del espacio ha de ser nula. Dentro de la aproximación HF, cada electrón siente la influencia del resto de los electrones como una distribución promedio. Ello conlleva que, la correlación de sus posiciones instantáneas sea ignorada, de modo que la probabilidad de encontrar a un electrón en un lugar dado del espacio no depende de la posición instantánea de los demás electrones, haciendo que la probabilidad de encontrar a dos electrones con distinto espín en el mismo lugar simultáneamente *no* sea nula.

Se define la energía de correlación como la diferencia entre la energía exacta no relativista y la energía HF: $E_{corr} = E_{exacta} - E_{HF}$. De modo que, aunque se usara una base infinita la energía obtenida por este método sería superior a la energía exacta. Se han desarrollado diferentes métodos para tener en cuenta este efecto. Tradicionalmente se conocen con el

nombre de métodos **post-HF**, ya que toman como punto de partida el modelo HF, y sobre él añaden correcciones como veremos a continuación.

Møller y Plesset (MP) propusieron la aplicación de la *teoría de perturbaciones* utilizando la solución de HF como punto de partida y la perturbación como la diferencia entre el Hamiltoniano electrónico de Hartree-Fock (suma de los operadores de Fock) y el verdadero.

$$\hat{H}' = \hat{H} - \hat{H}^0 = \sum_l \sum_{m>l} \frac{1}{r_{ml}} - \sum_{m=1} \sum_{j=1} \left[\hat{J}_j(r_m) - \hat{K}_j(r_m) \right] \quad (\text{II.2.29})$$

Este esquema permite encontrar una corrección a la energía y a la función de onda a un costo computacional razonable, aunque mucho mayor que HF. Si retrocedemos y observamos la ecuación II.2.12, vemos que el primer término corresponde a la energía del sistema sin perturbar, el segundo a la corrección de orden 1, y el tercero a la de orden 2. Es fácil demostrar que la suma de los dos primeros términos corresponde a la energía obtenida por el método HF. Si incluimos la corrección de orden 2 ($E^{(2)}$), esto es lo que hace el método *MP2*, obtenemos que la energía será: $E_{MP2} = E_{HF} - E^{(2)}$. El método MP2 es uno de los métodos más usados para incluir los efectos de la correlación en las propiedades de equilibrio del estado fundamental molecular.

La **teoría de "coupled-clusters" (CC)**, desarrollada por Cížek y Paldus en los 60'[9], sugiere que la función de onda exacta puede describirse como:

$$\Psi = e^{\hat{T}} \Phi_0 \quad (\text{II.2.30})$$

donde Ψ es la función de onda electrónica molecular exacta del estado fundamental; Φ_0 es la función de onda HF del estado fundamental y \hat{T} es un operador de excitación: $\hat{T} = \hat{T}_1 + \hat{T}_2 + \hat{T}_3 + \dots + \hat{T}_n$, donde \hat{T}_1 es el operador de excitación de una partícula, \hat{T}_2 es el operador excitación de dos partículas, etc... El efecto del operador $e^{\hat{T}}$ es expresar a Ψ como una combinación de determinantes de Slater que incluyen Φ_0 y todas las posibles excitaciones de los electrones desde los espín-orbitales ocupados a los virtuales. La mezcla en la función de onda de determinantes de Slater con distintos grados de excitación electrónica proporciona una estimación de la correlación electrónica.

En la práctica, el operador \hat{T} se aproxima considerando únicamente algunos de los operadores que lo componen. La teoría demuestra que la contribución más importante a \hat{T} la aporta \hat{T}_2 , dando lugar al método de clusters acoplados dobles (CCD). El siguiente paso para mejorar el método es incluir el operador \hat{T}_1 , lo cual da origen al método de clusters acoplados simples y dobles (CCSD). El método CCSDT, que incluye también las excitaciones de tres partículas, proporciona resultados muy precisos para las energías de correlación, pero consume mucho tiempo de cálculo y es factible únicamente para moléculas muy pequeñas. Uno de

los métodos actuales más utilizados para incluir de forma precisa la correlación electrónica es el CCSD(T), en el que el efecto de las excitaciones triples se incluye de forma aproximada, este método es muy utilizado como método de referencia.

II.2.1.3. Teoría del funcional de la densidad

Un procedimiento alternativo, y conceptualmente distinto, para obtener información acerca de un sistema y que permite calcular su energía incluyendo la correlación electrónica aparece con la Teoría del Funcional de la Densidad (DFT) [8]. Esta teoría fue desarrollada por Hohenberg y Kohn en 1964 [10]. El formalismo se diferencia de los demás métodos de estructura electrónica por el hecho de considerar la densidad electrónica total $\rho(r)$ como variable del sistema, en lugar de trabajar con la función de onda de los N_e electrones, $\Psi(r_1, r_2, \dots, r_{N_e})$. La densidad electrónica en función de Ψ se expresa como:

$$\rho(r) = \rho(r_1) = eN_e \int \cdots \int dr_2 dr_3 \cdots dr_{N_e} |\Psi(r_1, r_2, \dots, r_{N_e})|^2 \quad (\text{II.2.31})$$

Este enfoque tiene la gran ventaja de reducir el esfuerzo de hallar una función de $3N_e$ dimensiones (la función de onda de un sistema de N_e electrones) al de obtener una función de sólo tres dimensiones, como lo es la densidad electrónica $\rho(r)$.

Este formalismo parte de dos relaciones establecidas por Hohenberg y Kohn:

1. La función de onda del sistema es un *funcional* de la densidad electrónica $\rho(r)$.
2. Existe una relación unívoca entre ρ y $|\Psi\rangle$.

De este modo, la energía puede también considerarse un funcional de la densidad,

$$\langle \Psi | \hat{H}_e | \Psi \rangle = \varepsilon_e \equiv \varepsilon_e[\rho(r)] = T[\rho] + V_{ee}[\rho] + V_{ne}[\rho] \quad (\text{II.2.32})$$

Donde T refiere a la energía cinética, V_{ee} a la energía potencial de la interacción entre electrones y V_{ne} a la interacción entre núcleos y electrones. Hohenberg y Kohn aportaron otro aspecto importante en la teoría de los funcionales de la densidad, un *teorema variacional* similar al descrito para el caso HF. En éste se postula que para cualquier ρ' tal que $\int \rho'(r)dr = N$ y $\rho'(r) \geq 0$ en todo el espacio, entonces $E[\rho'] \geq E_0$. La igualdad se verifica si ρ' es la densidad del estado fundamental, lo que equivale a decir que ρ_0 minimiza el funcional de la energía $E[\rho]$ al igual que la función de onda del estado fundamental vuelve mínima la energía. Volviendo a la ecuación II.2.32, el término de interacción entre núcleos y electrones puede expresarse fácilmente mientras que la teoría no dice cómo calcular la expresión para los otros dos términos. Por otro lado vincula la energía con la densidad electrónica pero no prevé la forma de calcular una u otra. En el año 1965 Kohn y Sham [10] introdujeron

una aproximación para la forma funcional de la energía cinética, la enorme importancia que adquirió la teoría desde entonces se vio reflejada en el otorgamiento del premio Nobel al profesor Kohn en 1998.

Aproximación Kohn y Sham. Esta aproximación considera un sistema de referencia ficticio compuesto por electrones que no interactúan entre sí, cuya densidad ρ_R es igual a la densidad real ρ_0 . Entonces, el potencial externo debe ser tal que reproduzca en el sistema de N electrones independientes una densidad igual a la que corresponde a los N electrones interactuantes sometidos al potencial real. Si escribimos el Hamiltoniano para el sistema de referencia veremos que no hay términos de interacción interelectrónica, por lo que dicho Hamiltoniano se puede expresar como la suma de N_e Hamiltonianos unieletrónicos \hat{h}_i^{KS} , también llamados operadores de Kohn y Sham. Como en el sistema de referencia los electrones son independientes, la autofunción de \hat{H}_R , $|\Psi_R\rangle$ puede ser expresada como un determinante de Slater y la densidad electrónica se puede evaluar según:

$$\rho_R = \sum_i^N |\chi_i^{KS}|^2 \quad (\text{II.2.33})$$

Las funciones χ_i^{KS} son denominadas orbitales de Kohn-Sham, por analogía con HF. Volviendo al sistema real de electrones interactuantes, resulta conveniente definir la cantidad ΔT , como la diferencia entre la energía cinética verdadera y la del sistema de referencia que se puede calcular muy fácilmente en términos de los orbitales de KS y ΔV_{ee} como la contribución no clásica de la interacción entre electrones:

$$T_R[\rho] = -\frac{1}{2} \sum \nabla^2 \chi_i \quad (\text{II.2.34})$$

$$\Delta T[\rho] \equiv T[\rho] - T_R[\rho] \quad (\text{II.2.35})$$

$$\Delta V_{ee}[\rho] \equiv V_{ee} - \frac{1}{2} \int \int \frac{\rho(r_1)\rho(r_2)}{r_{12}} dr_1 dr_2 \quad (\text{II.2.36})$$

Estas dos cantidades sumadas, dan lugar a un nuevo término $E_{xc}[\rho]$, denominada energía de intercambio y correlación:

$$E_{xc}[\rho] = \Delta T[\rho] + \Delta V_{ee}[\rho] \quad (\text{II.2.37})$$

La expresión funcional final para la energía (Ecuación II.2.32) puede reescribirse como:

$$E[\rho] = T_R[\rho] + V_{ne}[\rho] + \frac{1}{2} \int \int \frac{\rho(r_1)\rho(r_2)}{r_{12}} dr_1 dr_2 + E_{xc}[\rho] \quad (\text{II.2.38})$$

Ahora, las contribuciones a la energía del estado fundamental son conocidas, salvo el término $E_{xc}[\rho]$, de modo que la exactitud del cálculo DFT depende de la aproximación que se elija para describir $E_{xc}[\rho]$. El funcional $E_{xc}[\rho]$ exacto suele descomponerse en la suma de distintos aportes energéticos:

- la correlación cinética definida en la Ecuación II.2.35,
- la correlación Coulómbica, asociada a la repulsión electrónica,
- el intercambio, relacionado con la propiedad de antisimetría para la función de onda de un sistema de fermiones,

Por lo tanto, si se tiene una forma funcional para $E_{xc}[\rho]$ se puede calcular la energía a partir de los orbitales de Kohn-Sham. Haciendo uso del principio variacional de Hohenberg y Kohn, de minimización de energía total respecto a las variaciones de la densidad sujeta a la condición de normalización de $|\Psi_R\rangle$, el problema se traduce en hallar el conjunto de orbitales de Kohn y Sham que minimizan la energía total electrónica, tal que:

$$\frac{\delta \varepsilon_e[\rho]}{\delta \rho} \Big|_{\rho=\rho_0} \quad (\text{II.2.39})$$

donde ρ_0 es la densidad electrónica del estado fundamental, como resultado se obtiene un conjunto de ecuaciones de autovalores denominadas de Kohn-Sham que tienen la siguiente forma:

$$\left[-\frac{1}{2} \nabla_1^2 - \sum_A \frac{Z_A}{r_{1A}} + \int \frac{\rho(r_2)}{r_{12}} dr_2 + \nu_{xc}(1) \right] |\chi_i^{KS}\rangle = \varepsilon_i^{KS} |\chi_i^{KS}\rangle \quad (\text{II.2.40})$$

donde el término ν_{xc} , es la derivada funcional de $E_{xc}[\rho]$. Existen diferentes niveles de aproximación para modelar este término. Es importante remarcar que los orbitales de Kohn y Sham fueron definidos para el sistema de referencia, por lo que no tienen un significado físico, son sólo una herramienta que permite calcular la densidad electrónica. Al igual que en el método HF, para encontrar los orbitales Kohn y Sham, se los expresa como combinación lineal de funciones base conocidas, lo que lleva a la obtención de un conjunto de ecuaciones equivalentes a las de Roothaan y que por ende se pueden expresar de forma matricial:

$$h^{KS}C = SC\varepsilon \quad (\text{II.2.41})$$

Al igual que para HF el sistema debe ser resuelto iterativamente, hasta la autoconsistencia.

Se han desarrollado diferentes esquemas para la obtención de formas aproximadas del funcional para la energía de correlación-intercambio. Los distintos funcionales se clasifican

según el modo en que tratan las componentes de correlación e intercambio. De este modo se puede hablar de aproximaciones de densidad local (LDA), en las que se asume que los efectos de correlación-intercambio son locales y dependen únicamente del valor de la densidad electrónica en cada punto (Ejemplo: VWN, PW92) [11, 12], y de correcciones de gradiente generalizado (GGA), en las que se tiene en cuenta no sólo el valor de la densidad en cada punto, sino también cómo varía esta densidad en sus alrededores (Ejemplo: PW86, PBE [13, 14, 15, 16]). Finalmente, también se ha explorado la introducción del intercambio exacto en lo que se conoce con el nombre de funcionales híbridos. Estos definen el funcional de intercambio como una combinación lineal de términos de intercambio HF, local y de corrección de gradiente (Ejemplo: B3LYP, B3PW91 [8, 7]).

II.2.1.4. Aplicación de un campo eléctrico uniforme externo

La aplicación externa de un campo eléctrico uniforme a un sistema de partículas cargadas se realiza resolviendo la ecuación de Schrödinger para el Hamiltoniano:

$$\hat{H}' = \hat{H} + \hat{H}^F \quad (\text{II.2.42})$$

donde \hat{H}' es el Hamiltoniano completo que incluye el potencial dado por un campo eléctrico homogéneo, \hat{H} es el Hamiltoniano de la ecuación II.2.4, y

$$\hat{H}^F = - \left(\sum_i q_i \hat{\mathbf{r}}_i \right) \cdot \vec{\mathbf{F}} \quad (\text{II.2.43})$$

es el operador potencial eléctrico externo donde $\vec{\mathbf{F}}$ es el vector del campo eléctrico aplicado, q_i es la carga de la partícula i , y $\hat{\mathbf{r}}_i$ es el vector posición de la partícula i . Podemos notar que:

$$\hat{\boldsymbol{\mu}} = \sum_i q_i \hat{\mathbf{r}}_i = \hat{i}\hat{\mu}_x + \hat{j}\hat{\mu}_y + \hat{k}\hat{\mu}_z \quad (\text{II.2.44})$$

es el operador momento dipolar eléctrico por lo que la ecuación II.2.43 queda como II.2.45 [17].

$$\hat{H}^F = -\hat{\boldsymbol{\mu}} \cdot \vec{\mathbf{F}} \quad (\text{II.2.45})$$

Dentro de la aproximación de Born-Oppenheimer el momento dipolar eléctrico de un sistema formado por electrones y una configuración de núcleos fijos se define como:

$$\boldsymbol{\mu} = -e \int \int \int \rho(x, y, z) \mathbf{r} \, dx \, dy \, dz + e \sum_{\alpha} Z_{\alpha} \mathbf{r}_{\alpha} \quad (\text{II.2.46})$$

donde e es la carga elemental, ρ es la densidad de probabilidad electrónica, Z es el número de protones del núcleo α .

En forma ilustrativa, se puede resolver la ecuación de Schrödinger del Hamiltoniano \hat{H}' utilizando la teoría de perturbaciones donde el operador perturbación es \hat{H}^F [8]. La corrección de primer orden a la energía es (ver ecuación II.2.12):

$$E^{(1)} = -\vec{F} \cdot \langle \Psi_n^0 | \hat{\mu} | \Psi_n^0 \rangle \quad (\text{II.2.47})$$

donde Ψ_n^0 es la función de onda no perturbada. Observemos que

$$\mu = \langle \Psi_n^0 | \hat{\mu} | \Psi_n^0 \rangle \quad (\text{II.2.48})$$

es el momento dipolar eléctrico permanente del sistema, o sea, el momento dipolar eléctrico en ausencia del campo eléctrico.

Una objeción de considerar II.2.48 como el momento dipolar total es que sólo se ha considerado la corrección a la energía de primer orden. La aplicación de un campo eléctrico distorsiona la función de onda Ψ_n^0 , dando por lo tanto un momento dipolar eléctrico inducido adicionalmente al momento dipolar permanente. El momento dipolar inducido corresponde en una primera aproximación a la corrección a la energía $E^{(2)}$. El momento dipolar inducido $\vec{\mu}_{ind}$ está relacionado con el campo eléctrico aplicado \vec{F} por:

$$\vec{\mu}_{ind} \approx \alpha \vec{F} \quad (\text{II.2.49})$$

donde α es el tensor de polarizabilidad del sistema de partículas. La polarizabilidad eléctrica de una molécula es una medida de su habilidad para responder a un campo eléctrico y a adquirir un momento dipolar eléctrico.

Así como el campo eléctrico interacciona con el momento dipolar también puede interactuar con momentos superiores como el momento cuadrupolar pero sólo si no es uniforme ya que éstos interaccionan con el gradiente de campo no nulo [17]. Por lo cual, si una molécula tiene un importante momento dipolar en relación con sus momentos eléctricos superiores, utilizar un campo eléctrico uniforme en vez de un gradiente de campo es una buena aproximación para su estudio.

El cambio de la energía de un sistema mecánico-cuántico causado por un campo eléctrico aplicado se lo denomina *efecto Stark* y el corrimiento de una frecuencia de vibración debido al mismo se lo denomina *efecto Stark vibracional*.

II.2.2. Modelos clásicos

En estos modelos, la naturaleza cuántica de los electrones e incluso éstos son ignorados, la energía del sistema depende únicamente de las posiciones nucleares. La función de energía potencial (dependiente de las posiciones nucleares) recibe el nombre de "*campo de fuerzas*" ya que el gradiente de esta función permite obtener las fuerzas que actúan sobre cada átomo. Al igual que en los métodos *ab-initio* se halla implícita en esta simplificación, la aproximación de Born-Oppenheimer. Dentro del campo de fuerzas, las interacciones entre los núcleos se agrupan en términos de unión, y términos de no unión. Los términos de unión describen de manera aproximada la interacción entre átomos que están unidos entre si directamente, o hasta 2 átomos de distancia. La energía de los términos de unión se descompone en distintas contribuciones: estiramiento de un enlace, flexión de un ángulo entre dos enlaces del mismo átomo, rotación de los átomos adyacentes sobre el eje de un enlace (Figura II.2.1).

Los términos de no unión describen la interacción entre átomos que están en diferentes moléculas o en la misma pero a más de tres enlaces de distancia. Poseen una contribución electrostática y una contribución debido a las interacciones de van der Waals (VDW) [18].

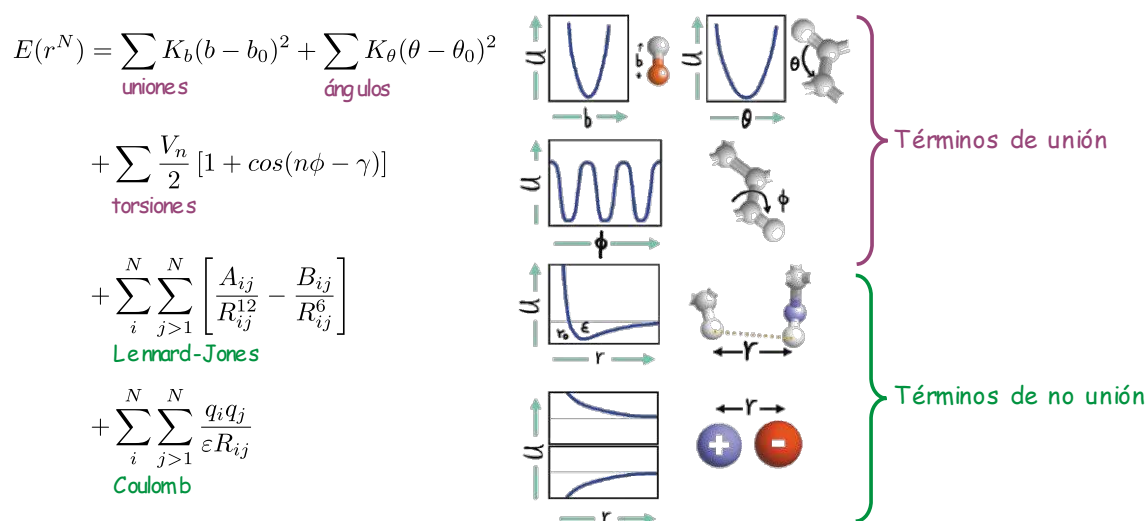


Figura II.2.1: Esquema de las interacciones de unión en un campo de fuerzas clásico.

Existen diferentes campos de fuerza clásicos y la diferencia entre ellos reside en los parámetros que utilizan en las ecuaciones y/o en la forma funcional. En este trabajo de tesis se ha utilizado el campo de fuerzas que se incluye en el paquete de programas de AMBER [19].

En el campo de fuerzas utilizado, la energía potencial es función de la posición de los N átomos del sistema y su forma funcional está representada en la Figura II.2.1. En la ecuación de esta figura se reconocen los diferentes términos antes mencionados:

- **Estiramientos:** la unión es descripta por un oscilador armónico según la Ley de Hooke.

El parámetro b_0 corresponde a la distancia de equilibrio de la unión y K es la constante de fuerza asociada a la unión. Si bien la curva de energía potencial de un enlace real no es exactamente armónica, esta aproximación es razonablemente buena. Es claro que este potencial no permite la ruptura del enlace.

- **Flexión angular:** también es descripta por un potencial armónico, donde θ_0 es el valor de equilibrio del ángulo y K_θ la constante de fuerza. Típicamente, los ángulos son más susceptibles a la deformación que los enlaces, de modo que las constantes de fuerza angulares poseen valores entre $30\text{-}80 \text{ kcal.mol}^{-1}.\text{rad}^{-1}$ y las de enlace entre $200\text{-}500 \text{ kcal.mol}^{-1}.\text{\AA}^{-1}$.
- **Torsión:** ϕ es el valor del ángulo diedro, el término V_n está relacionado con la magnitud de la barrera entre dos mínimos adyacentes, "n" es la multiplicidad, la que indica cuántos mínimos hay para la rotación entre 0 y 360 grados, y " γ " es la fase que determina que el ángulo pase por el primer mínimo.
- **Término de no unión:** este término generalmente se divide en dos contribuciones, la electrostática y la de VDW. La interacción electrostática es consecuencia de la distribución asimétrica de la densidad de carga en las moléculas. Si sólo se tuviera en cuenta la interacción electrostática con cargas de signos opuestos se atraerían hasta colapsar en el mismo punto del espacio, obteniéndose un valor infinito de energía. Una fórmula que describe de manera adecuada este tipo de interacción repulsiva a corto alcance y dispersiva a largo alcance, es el potencial de *Lennard-Jones*. El potencial de Lennard-Jones posee dos parámetros que dependen del par de átomos en cuestión, estos son: la distancia del mínimo de energía entre ambos átomos (R_{ij}^*) y el valor para la energía en ese punto (ε_{ij}). Los parámetros están tabulados según el tipo de átomo, de manera que para encontrar los parámetros correspondientes a la interacción del par de átomos i, j , se utilizan las siguientes reglas de combinación: $R_{ij}^* = (R_i^* + R_j^*)$ y $\varepsilon_{ij} = \sqrt{\varepsilon_i \varepsilon_j}$. Luego los términos de la ecuación del campo de fuerzas se calculan como $A_{ij} = \varepsilon_{ij}(R_{ij}^*)^{12}$ y $B_{ij} = 2\varepsilon_{ij}(R_{ij}^*)^6$. El cálculo del término de no unión es el más costoso, por ello sólo típicamente son calculados entre los pares de átomos que se encuentran a una distancia menor que un valor de corte elegido por el usuario (radio de corte), usualmente son mayores a 8 \AA [18].

II.2.3. Superficie de energía potencial

El curso de una reacción química está determinado por la función de energía potencial $U(q_\alpha)$, donde q_α indica las coordenadas de los N núcleos de las moléculas reactivas. Para

obtener la superficie de energía potencial (SEP) $U(q_\alpha)$, deberíamos resolver la ecuación de Schrödinger electrónica para un gran número de configuraciones nucleares, lo cual es una tarea ardua y en la mayoría de los casos, imposible. Conocer la SEP en forma completa nos permitiría saber todas las propiedades termodinámicas y cinéticas del sistema, pero para sistemas de 3, 4 y 5 átomos se precisan del orden de 10^3 , 10^6 , y 10^9 cálculos. Excepto para sistemas de muy pocos átomos, esto es imposible y por lo tanto nos conformamos con encontrar los puntos más importantes sobre la superficie. Se intenta, entonces, localizar los puntos de la superficie en los cuales las derivadas primeras $\frac{\partial U}{\partial q_\alpha}$ (las componentes del gradiente) son cero. Estos son los llamados puntos estacionarios. Un punto estacionario puede ser un mínimo local, un máximo local o un punto silla. Para determinar la naturaleza del punto estacionario, se evalúan las $(3N-6)^2$ derivadas segundas $\frac{\partial^2 U}{\partial q_\alpha \partial q_\alpha}$ (componentes de la matriz Hessiana) en dichos puntos. Estas derivadas segundas se utilizan también para obtener las frecuencias vibracionales en los puntos estacionarios y así caracterizarlos. En un mínimo local, todas las frecuencias vibracionales son números reales. Para el estado de transición (punto silla) se encuentra una única frecuencia imaginaria entre las reales. Los mínimos locales corresponden a reactivos, productos o intermediarios de reacción.

Minimización de la energía. La SEP puede poseer muchos mínimos locales y el menor de todos corresponde al mínimo global. Para la búsqueda de estos puntos se utiliza un algoritmo de minimización. Los algoritmos de minimización de primer orden (aquellos que utilizan únicamente las derivadas primeras) más frecuentemente utilizados son el *steepest descend* y el de gradientes conjugados (GC) [20]. Estos algoritmos en cada etapa de búsqueda se mueven según lo dictamine el gradiente ($-\nabla U$, gradiente) el que indica dirección y sentido para el cual U decrece más rápidamente. Además de usar el gradiente, algunos métodos de minimización de energía usan también las derivadas segundas de U . El conjunto de derivadas segundas cuando se dispone en una ordenación cuadrada, forman la matriz denominada Hessiana o matriz de constantes de fuerza (H). Un ejemplo de este tipo de algoritmos es el Newton-Raphson, éste aproxima U por un desarrollo de Taylor, el que se usa para evaluar en forma precisa el gradiente y H . Una variación de este método, que lo hace menos costoso, consiste en partir de una estimación de H que gradualmente se mejora (cuasi-Newton). Dentro de estos métodos, uno mejor y más eficiente es Eigenmode-Following (EF), éste calcula los autovalores y autovectores de H y los utiliza para la búsqueda del punto estacionario. El algoritmo "Berny" [21] utilizado por el programa Gaussian utiliza un algoritmo similar a éste.

Mientras que las propiedades termodinámicas están relacionadas con los mínimos de energía y la energía relativa entre éstos, la cinética de un proceso viene determinada por la altura de la barrera (Energía de activación) que separa los mínimos relevantes del sistema. Al camino de mínima energía que conecta reactivos y productos sobre la SEP se lo conoce

como camino de reacción. El punto de máxima energía sobre este camino corresponde al estado de transición (punto silla). Al estado de transición se lo debe vincular a los mínimos a través de la coordenada de reacción para poder definir el perfil de reacción.

Dinámica molecular. Las moléculas grandes pueden tener un número enorme de conformaciones que son accesibles. Usualmente se está interesado en obtener no sólo la conformación de más baja energía (mínimo global), sino también los mínimos cuyas energías son lo suficientemente bajas como para que estas conformaciones tengan poblaciones significativas a temperatura ambiente. Los conformeros biológicamente activos de una biomolécula podrían no ser conformaciones cercanas al mínimo global. Actualmente, no existe ningún método que garantice que puede encontrar el mínimo global y todos los mínimos más bajos de una molécula flexible grande. La dinámica molecular calcula la progresión temporal "real del sistema" de modo que las propiedades termodinámicas extraídas correspondan de manera precisa con los valores reales. Las posiciones atómicas de los átomos del sistema son propagadas temporalmente integrando las ecuaciones de movimiento de Newton. Se aplica entonces la segunda ley de Newton a cada átomo, donde cada componente de la fuerza sobre el átomo i se calcula como $F_{x,i} = \frac{\partial U}{\partial x_i}$, y U se obtiene a partir del campo de fuerzas de la mecánica molecular. Se integra numéricamente la segunda ley de Newton (algoritmo de Verlet [22]) para obtener la posición de cada átomo en los tiempos $\Delta t, 2\Delta t, 3\Delta t, \dots$, donde el intervalo de tiempo Δt es, habitualmente, 10^{-15} s, y se puede seguir los movimientos atómicos, del orden de 10^{-9} s. Existen varias razones por las cuales el investigador puede querer controlar la temperatura, en particular si se desea conocer el comportamiento del sistema al variarla, o simplemente para estudiar reacciones a temperatura constante. Uno de los métodos más usados para mantener la temperatura fija en un valor deseado en una simulación de dinámica molecular es el algoritmo de Berendsen [23]. El termostato de Berendsen acopla al sistema un baño térmico (a la temperatura deseada) que actúa como fuente o sumidero de energía térmica.

II.2.4. Espectroscopía vibracional de moléculas poliatómicas

La espectroscopía molecular engloba las transiciones que se producen entre los niveles de energía rotacionales, vibracionales y electrónicos de una molécula, y dan lugar, respectivamente, a los espectros microondas, infrarrojo-Raman y visible-ultravioleta. Las moléculas diatómicas poseen un pequeño número de grados de libertad internucleares, uno vibracional y dos rotacionales. Mientras que en las moléculas poliatómicas (con N número de átomos; $N > 2$) el número de grados de libertad vibracional es mucho mayor: $3N - 6$ o $3N - 5$ en mo-

lécúlas lineales, donde los números 6 y 5 corresponden a los 3 grados de libertad traslacional más 3 o 2 rotacionales.

La aproximación de Born-Oppenheimer permite tratar por separado los movimientos electrónicos de los nucleares, así, a valores fijos de las coordenadas nucleares, podemos determinar las funciones de onda y energías electrónicas. De esta forma, y utilizando la ecuación de Schrödinger nuclear (ecuación II.2.50), es posible determinar el movimiento de los núcleos de las moléculas:

$$\left[-\frac{\hbar^2}{2} \sum_{\alpha} \frac{1}{m_{\alpha}} \nabla_{\alpha}^2 + U(r_{\alpha}) \right] \psi_{nuclear}(r_{\alpha}) = E \psi_{nuclear}(r_{\alpha}) \quad (\text{II.2.50})$$

donde $U(r_{\alpha})$ es la energía potencial efectiva a la cuál están sujetas los núcleos α , la cual depende de la posición de los mismos, y es la energía cinética electrónica más la potencial coulúmbica dada por los núcleos y electrones.

Para resolver el problema para moléculas poliatómicas, en principio debemos determinar $U(x_1, y_1, z_1, \dots, x_N, y_N, z_N)$ que es función de cada una de las coordenadas cartesianas de los núcleos. Por conveniencia realizaremos un cambio de variable a **coordenadas cartesianas de desplazamiento ponderadas** definidas como:

$$q_1 = m_1^{\frac{1}{2}}(x_1 - x_{1,e}), \quad q_2 = m_1^{\frac{1}{2}}(y_1 - y_{1,e}), \quad q_3 = m_1^{\frac{1}{2}}(z_1 - z_{1,e}), \quad \dots, \\ q_{3N-2} = m_N^{\frac{1}{2}}(x_N - x_{N,e}), \quad q_{3N-1} = m_N^{\frac{1}{2}}(y_N - y_{N,e}), \quad q_N = m_N^{\frac{1}{2}}(z_N - z_{N,e}) \quad (\text{II.2.51})$$

donde el subíndice e denota que corresponde a la molécula en un mínimo de energía, y m es la masa de cada núcleo.

En una primera aproximación es posible expresar la energía potencial efectiva como un desarrollo en serie de Taylor de las coordenadas q_i en torno a sus valores de equilibrio y despreciar los términos de órdenes superiores a los cuadráticos:

$$U \approx U_e + \sum_{i=1}^{3N} \left(\frac{\partial U}{\partial q_i} \right)_e q_i + \frac{1}{2!} \sum_{i=1}^{3N} \sum_{j=1}^{3N} \left(\frac{\partial^2 U}{\partial q_i \partial q_j} \right)_e q_i q_j \quad (\text{II.2.52})$$

Considerando que las primeras derivadas de U corresponden a las fuerzas y al estar en un mínimo todas éstas son cero es posible eliminar este término. U_e es la energía potencial en el punto de equilibrio y se tomará por conveniencia a este valor como cero también. Por lo que se obtiene que:

$$U \approx \frac{1}{2!} \sum_{i=1}^{3N} \sum_{j=1}^{3N} \left(\frac{\partial^2 U}{\partial q_i \partial q_j} \right)_e q_i q_j = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^{3N} \sum_{j=1}^{3N} u_{ij} q_i q_j = \frac{1}{2} \tilde{q} \mathbf{V} q \quad (\text{II.2.53})$$

donde u_{ij} son las **constantes de fuerza armónicas** para las coordenadas de desplazamiento ponderadas. A la derecha de II.2.53 está la misma ecuación escrita en forma matricial donde \mathbf{V} es la matriz que tiene por elementos a u_{ij} , la cual se la denomina matriz Hessiana. A continuación se procederá a encontrar un nuevo sistema de coordenadas que permitirá alcanzar la resolución del movimiento nuclear. Escrita en forma matricial la ecuación II.2.54 relaciona el sistema de coordenadas cartesianas de desplazamiento ponderadas q con el nuevo sistema de coordenadas Q escritos en forma vectorial. Estas nuevas coordenadas son denominadas **coordenadas normales de vibración** donde los elementos de la matriz L son los responsables de dicha transformación.

$$q = \mathbf{L}Q \quad (\text{II.2.54})$$

La matriz L es la matriz de autovectores de V dada por la ecuación:

$$\mathbf{V}\mathbf{L} = \mathbf{L}\mathbf{\Lambda} \quad (\text{II.2.55})$$

donde $\mathbf{\Lambda}$ es la matriz diagonal que contiene los autovalores λ_k que son las constantes de fuerza del modo normal k . La frecuencia vibracional ν_k se determina como:

$$\nu_k = \frac{\sqrt{\lambda_k}}{2\pi} \quad (\text{II.2.56})$$

Es posible reescribir el potencial efectivo en función de las coordenadas normales:

$$U \approx \frac{1}{2} \tilde{Q} \mathbf{\Lambda} Q \quad (\text{II.2.57})$$

Ahora utilizando las coordenadas normales de vibración y sus constantes de fuerza es posible escribir la ecuación de Schrödinger vibracional que viene dada por:

$$\left[-\frac{\hbar^2}{2} \sum_{k=1}^{3N-6} \frac{\partial^2}{\partial Q_k^2} + \frac{1}{2} \sum_{k=1}^{3N-6} \lambda_k Q_k^2 \right] \psi_{vib.} = E_{vib.} \psi_{vib.} \quad (\text{II.2.58})$$

Resolviendo esta ecuación se encuentra que la energía vibracional total es:

$$E_{vib.} = \sum_{k=1}^{3N-6} \varepsilon_{v_k} = \sum_{k=1}^{3N-6} \left(v_k + \frac{1}{2} \right) h\nu_k \quad (\text{II.2.59})$$

donde ε_{v_k} es la energía vibracional del modo k , y v_k es un número entero mayor e igual a cero, e indica el nivel vibracional. La energía más baja, la **energía del punto cero**, es aquella para la que todos los modos normales de la molécula oscilan en sus estados fundamentales, o sea, cuando $v_k = 0$ [24].

II.2.5. Simulaciones de dinámica molecular dirigidas

La dinámica molecular dirigida, por sus siglas en inglés MSMD (*Multiple Steering Molecular Dynamics*), es una técnica novedosa para calcular perfiles de energía libre que se basa en la realización de múltiples simulaciones de dinámica molecular dirigidas. Fue propuesta originalmente por C. Jarzynski [25]. El método MSMD establece una relación entre propiedades de dinámicas de no-equilibrio y de equilibrio [26, 27] la cual permite el cálculo del perfil de energía libre de un proceso a partir de múltiples procesos irreversibles. La termodinámica estadística establece que el trabajo promedio \overline{W} ejercido sobre un sistema termalizado será siempre mayor o igual que el cambio de energía libre de Helmholtz (ΔA) de dicho proceso (ecuación II.2.60).

$$\overline{W} \geq \Delta A \quad (\text{II.2.60})$$

Cuando el trabajo se realiza de modo infinitamente lento, éste se vuelve reversible y se cumple la igualdad de la ecuación II.2.60. En caso contrario, cuando el trabajo es irreversible (el trabajo es realizado a tiempo finito) se cumple la desigualdad y no se puede determinar el cambio de energía libre con esta relación. La relación de Jarzynski (II.2.61) establece una igualdad que permite estimar ΔA a partir del promedio exponencial de múltiples trabajos irreversibles:

$$\Delta A(\lambda) = -k_B T \ln \left(\overline{e^{-\frac{W(\lambda)}{k_B T}}} \right) \quad (\text{II.2.61})$$

siendo k_B la constante de Boltzmann, T la temperatura y λ el parámetro dependiente del tiempo que se varía para realizar dicho trabajo que puede ser, por ejemplo, la distancia o el ángulo de la coordenada de una reacción. El resultado que se obtiene con esta ecuación es independiente del camino elegido para llegar al estado final desde el inicial, y de la velocidad a la cual λ se mueve a lo largo de dicho camino, aunque el promedio de la ecuación II.2.61 converge al valor exacto sólo cuando se realiza un número elevado de simulaciones.

Para el caso que λ es una distancia entre dos átomos, el trabajo se determina como:

$$W(\lambda) = \int_{\lambda_0}^{\lambda} F d\lambda \quad (\text{II.2.62})$$

donde F es la fuerza aplicada para mover la variable λ dependiente del tiempo. De esta manera, se obtienen distintos perfiles del trabajo en función de la distancia y con la ecuación II.2.61 perfiles de energía libre en función de la distancia. El trabajo debe realizarse partiendo de un ensamble en equilibrio térmico. Posteriormente se extenderá la metodología para el caso particular en el que se utilizó MSMD.

II.2.6. Modelado del solvente

El hecho de introducir una molécula de soluto polar en un disolvente polar produce una serie de efectos de orientación e inducción de momentos dipolares sobre ambos. El resultado de dichos efectos es que el disolvente adquiere una polarización global en la región que rodea a cada molécula de soluto. El solvente polarizado genera un campo eléctrico que produce en el soluto un momento dipolar inducido que se suma al momento dipolar permanente de la molécula aislada. En consecuencia, la función de onda electrónica molecular y todas las propiedades moleculares en disolución diferirán en mayor o menor extensión de las obtenidas en fase gaseosa. Una forma de tener en cuenta el efecto del solvente es considerarlo en forma explícita. Otra técnica comúnmente utilizada para calcular los efectos del disolvente es el empleo de un modelo continuo. En este caso, la estructura del disolvente se ignora y este se modela como un dieléctrico continuo de extensión infinita que rodea una cavidad que contiene la molécula de soluto. El dieléctrico continuo se caracteriza por su constante dieléctrica y la molécula de soluto puede tratarse clásicamente o cuánticamente. En el tratamiento cuántico, la interacción entre la molécula de soluto y el continuo que la rodea se simula mediante un término de energía que se añade al Hamiltoniano. En la implementación usual del modelo de solvatación continuo, se permite que cambien la función de onda electrónica y la densidad electrónica de la molécula al pasar de fase gaseosa a fase disolución, de forma que se alcance la autoconsistencia entre la distribución de carga del soluto y el campo eléctrico creado por el solvente (SCRF) [8, 28]. Existen muchas versiones de los modelos SCRF, las diferencias radican en la elección del tamaño y forma de la cavidad que contiene al soluto y en el cálculo de la energía de interacción soluto-solvente. En este trabajo particularmente se utilizó el método PCM que modela la cavidad del soluto a partir de superposición de esferas ubicadas en el centro de cada elemento utilizando los radios de van der Waals correspondientes a cada tipo de átomo.

II.2.7. Programas utilizados

Los métodos teóricos previamente descriptos han sido implementados en diferentes programas. En lo que sigue se describirán brevemente los programas que han sido utilizados en este trabajo de tesis.

Gaussian98 y 03. Es un paquete de programas que llevan a cabo distintos tipos de cálculos de estructura electrónica [29]. Incluye todos los métodos *ab-initio* comunes, muchos métodos semi-empíricos y los métodos DFT. Utiliza bases Gaussianas. Parte de los cálculos realizados en este trabajo se llevaron a cabo utilizando este programa.

Tipos de bases y métodos utilizados. En este trabajo de tesis se han utilizado diferentes métodos, entre ellos podemos nombrar: HF, DFT(BP86, B3LYP, PBE1PBE)[8, 7].

Estos métodos han sido combinados con distintas bases según el sistema en estudio: 6-31G** (doble zeta polarizada), 6-311+G* (triple zeta: simple Z para el core y triple Z para los OA de valencia, con funciones de polarización y funciones difusas), SDD (Dunning/Huzinaga doble zeta de valencia (D95V) para elementos livianos y pseudopotenciales¹ de Stuttgart-Dresden para elementos más pesados que el Ar), TZV (Triple Zeta de Valencia).

Análisis Vibracional. Se basa en el cálculo de modos normales con los cuales mediante fórmulas de la mecánica estadística y usando las aproximaciones de rotor rígido, oscilador armónico y gases ideales se obtienen la frecuencia de los modos normales, la entropía, entalpía, energía de punto cero (ZPE), energía libre y los efectos térmicos estimados a partir de correcciones que tienen en cuenta los cambios producidos por la temperatura en las poblaciones de los niveles vibracionales, rotacionales y traslacionales de las especies consideradas.

Parametrización de cargas parciales. Para realizar las parametrizaciones pertinentes en las simulaciones de dinámica molecular se han calculado cargas RESP que son cargas atómicas parciales ajustadas de manera de reproducir el potencial electrostático molecular [30].

SIESTA (*Spanish Initiative for Electronic Structure Simulations of Thousands of Atoms*) [31, 32]. Es una implementación de DFT, pero a diferencia de la mayoría de las implementaciones de DFT, el código SIESTA utiliza funciones de base numéricas fijas definidas en una grilla tridimensional finita. Para sistemas de muchos átomos, esto lo hace extremadamente rápido y eficiente en comparación con programas que usan Gaussianas u ondas planas. Otra ventaja del uso de funciones numéricas es que la función puede adoptar la forma que se desee. En particular, estas funciones numéricas se ajustan a los llamados "Orbitales Pseudo Atómicos" (PAO), que corresponden a las autofunciones del pseudopotencial atómico confinado a una esfera de potencial infinito (más allá de la esfera la función de onda vale cero). En este esquema de cálculo el tiempo computacional crece más lentamente con el número de átomos, lo que permite tratar sistemas con un número de átomos relativamente grande, en tiempos razonables. Una consecuencia del confinamiento, es que los PAOs poseen una mayor energía cinética que las autofunciones no confinadas. Este incremento de energía se mantiene igual para todos los PAOs, obteniéndose de esta forma una base balanceada. La magnitud de este incremento o "*pseudoatomic orbital energy shift*" (ΔPAO) es un parámetro variable que debe ser ajustado por el usuario. Para moléculas de tamaño mediano, valores de ΔPAO cercanos a 100 meV permiten obtener resultados similares a los obtenidos con bases

¹Pseudopotenciales o *Effective Core Potentials* (ECP): es una construcción que incluye al núcleo del átomo junto con los electrones internos, y que permite que sólo sea necesario calcular explícitamente las interacciones de los electrones de valencia, y que se puedan representar adecuadamente y a bajo costo los efectos relativistas que pueden ser relevantes en átomos pesados.

Gaussianas de tamaño convencional. En el caso de querer utilizar moléculas que contienen metales de transición como Cu, Pt, o Fe se requiere usar valores menores, del orden de 20-30 meV. Los núcleos y electrones internos están descriptos por pseudopotenciales.

Actualmente, el programa SIESTA contiene funcionales de intercambio y correlación del tipo LDA, y el funcional GGA PBE. Otro parámetro importante que debe determinar el usuario es la precisión de la grilla, *Energy cut off* (E_{cut}). Esto se determina eligiendo la energía correspondiente a una onda plana de la máxima frecuencia posible que entre en la grilla. Valores entre 100-200 Rydbergs aseguran una buena precisión.

Mediante el uso de este programa se optimizaron moléculas de gran tamaño como porfirinas.

AMBER. Es un paquete de programas para realizar dinámica molecular que contiene entre otros el campo de fuerzas de Wang [19]. Se utilizó para realizar las simulaciones de dinámica molecular.

Visualizadores Gráficos. Molden², Gaussview 3.0³, VMD⁴.

Por último, al igual que para la parte experimental, se encontrará una descripción detallada y específica de la metodología de trabajo en las distintas partes y secciones de este trabajo de Tesis.

II.2.8. Programas efectuados

Para llevar a cabo varios objetivos puntuales se efectuaron numerosos programas para hacer tareas muy específicas de análisis y procesamiento de datos en distintos lenguajes como el *FORTRAN 77* y *90*, *TCL* (Para utilizar dentro del *VMD*), *Visual Basic* (Para programar funciones para el *EXCEL*) y *Unix Bash Scripting*. Se mencionan algunos de ellos:

- **PLANEFIT:** Ajusta un plano sobre una serie de puntos en el espacio tridimensional. Se utilizó para encontrar el vector perpendicular al plano de mejor ajuste de una porfirina. Este fue el criterio elegido en muchas ocasiones para seleccionar el vector de campo a aplicar.
- **RHODAS:** Interconvierte entre distintos formatos de archivos de coordenadas cartesianas como *.pdb*, *.xyz*, y archivos de entrada y salida del SIESTA y Gaussian.
- **EFLD:** Calcula el campo eléctrico y el potencial electrostático dentro de un sistema de partículas puntuales cargadas. Además, calcula la energía del sistema de partículas

²<http://www.cmbi.kun.nl/molden/molden.html>

³<http://www.gaussian.com>

⁴<http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/>

cargadas en presencia de un campo eléctrico. Ésto se utilizó en la determinación de la energía del citocromo c en presencia de un campo eléctrico uniforme.

- **DIPOLE:** Calcula el momento dipolar de un sistema de partículas puntuales cargadas.
- **MOVEAXISORIGIN:** Rota un sistema de partículas al nuevo sistema de ejes elegido y traslada el origen al centro geométrico o a otra posición deseada. Se utilizó para rotar las porfirinas y colocar al vector perpendicular al plano de su anillo sobre el eje-z. Esto fue necesario para poder aplicarle un campo con el Gaussian 03.
- Un paquete de funciones programadas en Visual Basic para realizar los análisis de datos dentro de programas de plantillas de datos como el Excel. Estas funciones utilizan distintos algoritmos para resolver problemas matemáticos como diagonalización de matrices, cálculos de SVD, ajuste de polinomios, búsqueda de raíces, programación numérica de funciones como la Voigt, optimización de variables para ajustar los parámetros de los modelos propuestos a los datos obtenidos, etc.
- Programa que adquiere datos del Potenciostato y del Lockin y calcula la capacidad en función del potencial aplicado (III.3.3.4)
- Programa que controla el dispositivo inmersor del electrodo (III.3.3.3)
- Programa que procesa los datos de la carga en los experimentos del potencial de carga cero y extrapola el valor de potencial de carga cero de los datos (III.3.3.3)

Por otra parte también se modificó el código del programa AMBER para permitir la aplicación de campos eléctricos a los sistemas clásicos estudiados y la implementación de potenciales de Morse para poder describir la ruptura de enlaces seleccionados.

II.3

Bibliografía

- [1] J. T. Grant y D. Briggs, editors. *Surface Analysis by Auger and X-ray Photoelectron Spectroscopy*. IM Publications, Chichester, UK, 2003.
- [2] C. Bai. *Scanning tunneling microscopy and its applications*. Springer Verlag, New York, 2nd edition, 1999.
- [3] C. Julian Chen. *Introduction to Scanning Tunneling Microscopy*. 1993.
- [4] Daniel C. Harris y Michael D. Bertolucci. *Symmetry and Spectroscopy: An Introduction to Vibrational and Electronic Spectroscopy*. Dover Publications, 1989.
- [5] R. K. Khanna. *Theoretical and experimental resonance Raman intensities for the manganate ion*. John Wiley and Sons, 1974.
- [6] David L. Jeanmaire y Richard P. van Duyne. Surface Raman Electrochemistry Part I. Heterocyclic, Aromatic and Aliphatic Amines Adsorbed on the Anodized Silver Electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 84:1–20, 1977.
- [7] A. Szabo y N. S. Ostlund. *Modern Quantum Chemistry*. Mc Graw-Hill Publishing Company, New York, 1989.
- [8] Ira N. Levine. *Quantum Chemistry*. Prentice-Hall, New Jersey, 5th edition, 2000.
- [9] R. J. Bartlett. Accurate Coupled-Cluster Solutions of the Molecular Schrodinger-Equation - A Citation Classic Commentary on Many-Body Perturbation-Theory, Coupled-Pair Many-Electron Theory, and the Importance of Quadruple Excitations for the Correlation-Problem Bartlett, R.J., Purvis, G.D. *Current Contents/Physical Chemical & Earth Sciences*, pages 20–20, 1989.

-
- [10] W. Kohn y L. J. Sham. Self-consistent equations including exchange and correlation effects. *Physical Review*, 140:1133–&, 1965.
- [11] J. P. Perdew, K. Burke, y M. Ernzerhof. Generalized gradient approximation made simple. *Physical Review Letters*, 77:3865–3868, 1996.
- [12] S. H. Vosko, L. Wilk, y M. Nusair. Accurate spin-dependent electron liquid correlation energies for local spin-density calculations - a critical analysis. *Canadian Journal of Physics*, 58:1200–1211, 1980.
- [13] J. P. Perdew y Y. Wang. Accurate and simple analytic representation of the electron-gas correlation-energy. *Physical Review B*, 45:13244–13249, 1992.
- [14] J. P. Perdew y W. Yue. Accurate and simple density functional for the electronic exchange energy - generalized gradient approximation. *Physical Review B*, 33:8800–8802, 1986.
- [15] J. P. Perdew. Generalized gradient approximation for the fermion kinetic-energy as a functional of the density. *Physics Letters A*, 165:79–82, 1992.
- [16] C. T. Lee, W. T. Yang, y R. G. Parr. Development of the colle-salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron-density. *Physical Review B*, 37:785–789, 1988.
- [17] Peter William Atkins. *Molecular Quantum Mechanics*. Oxford University Press, Oxford, 2nd edition, 1983.
- [18] A. R. Leach. *Molecular Modeling*. Longman, 1997.
- [19] J. M. Wang, P. Cieplak, y P. A. Kollman. How well does a restrained electrostatic potential (resp) model perform in calculating conformational energies of organic and bio logical molecules? *Journal of Computational Chemistry*, 21:1049–1074, 2000.
- [20] W. H. Press, S. A. Teulosky, W. T. Vetterling, y B. P. Flannery. *Numerical Recipes. The Art of Scientific Computing*. Cambridge University Press, Cambridge, 1992.
- [21] H. B. Schlegel. Optimization of equilibrium geometries and transition structures. *Journal of Computational Chemistry*, 3:214–218, 1982.
- [22] L. Verlet. Computer Experiments on Classical Fluids. I. Thermodynamical Properties of Lennard-Jones Molecules. *Physical Review*, 159:98, 1967.

- [23] H. J. C. Berendsen, J. P. M. Postma, W. F. Vangunsteren, A. Dinola, y J. R. Haak. Molecular-Dynamics with Coupling to an External Bath. *Journal of Chemical Physics*, 81:3684–3690, 1984.
- [24] Alberto Requena Rodríguez y José Zúñiga Román. *Espectroscopía*. PEARSON EDUCACIÓN S. A., Madrid, 2004.
- [25] C. Jarzynski. Nonequilibrium Equality for Free Energy Differences. *Physical Review Letters*, 78(14):2690–2693, 1997.
- [26] J. VandeVondele y U. Rothlisberger. Accelerating rare reactive events by means of a finite electronic temperature. *Journal of the American Chemical Society*, 124(27):8163–71, 2002.
- [27] G. Hummer y A. Szabo. Free energy reconstruction from nonequilibrium single-molecule pulling experiments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98:3658–3661, 2001.
- [28] Orlando Tapia y Juan Bertrán, editors. *Understanding Chemical Reactivity*, volumen 17: Solvent Effects and Chemical Reactivity. Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 1996.
- [29] M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, J. R. Cheeseman, V. G. Zakrzewski, J. A. Jr. Montgomery, R. Stratmann, J. Burant, S. Dapprich, J. M. Millam, A. D. Daniels, K. N. Kudin, M. C. Strain, O. Farkas, J. Tomasi, V. Barone, M. Cossi, R. Cammi, B. Mennucci, C. Pomelli, C. Adamo, S. Clifford, J. Ochterski, G. A. Petersson, P. Y. Ayala, Q. Cui, K. Morokuma, D. K. Malick, A. D. Rabuck, K. Raghavachari, J. B. Foresman, J. Cioslowski, J. V. Ortiz, A. G. Baboul, B. B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R. Gomperts, R. L. Martin, D. J. Fox, T. Keith, M. A. Al-Laham, C. Y. Peng, A. Nanayakkara, C. Gonzalez, M. Challacombe, P. M. W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M. W. Wong, J. L. Andres, M. Head-Gordon, E. S. Replogle, y J. A. Pople. *Gaussian 98, Rev.A7*, Gaussian, Inc., Pittsburgh PA, 1998.
- [30] U. C. Singh y P. A. Kollman. An approach to computing electrostatic charges for molecules. *Journal of Computational Chemistry*, 5:129–145, 1984.
- [31] J. M. Soler, E. Artacho, J. D. Gale, A. Garcia, J. Junquera, P. Ordejon, y D. Sanchez-Portal. The SIESTA method for ab initio order-N materials simulation. *Journal of Physics-Condensed Matter*, 14:2745–2779, 2002.

- [32] D. Sanchez Portal, P. Ordejon, E. Artacho, y J. M. Soler. Density-functional method for very large systems with LCAO basis sets. *International Journal of Quantum Chemistry*, 65:453–461, 1997.

III

Desarrollo

III.1

Efecto del campo eléctrico en la reactividad de porfirinas

III.1.1. Introducción

Con sólo unas pocas excepciones, los grupos prostéticos hémicos de proteínas solubles y unidas a membranas actúan típicamente como sitios donores/aceptores de electrones involucrados tanto en la traducción electro-protónica de energía como en catálisis redox [1, 2].

Muchos de estos procesos, como la fosforilación oxidativa y la fotosíntesis, ocurren al nivel de membranas biológicas donde campos eléctricos de moderados a fuertes pueden estar presentes debido al potencial transmembranal, superficial y dipolar [3, 4]. Mientras el potencial transmembranal es la consecuencia directa del gradiente iónico a través de la membrana, el potencial superficial y dipolar surge de los componentes eléctricamente cargados de la interfaz membrana-solución y del alineamiento de los residuos dipolares dentro de la membrana, respectivamente. Para una membrana modelo totalmente saturada de fosfatidilcolina, la magnitud del campo eléctrico puede alcanzar valores de hasta 0.1 V \AA^{-1} [5].

Está bien documentado que los cambios conformacionales inducidos por el potencial de membrana juegan un rol activo en la modulación de la actividad de las proteínas de membrana transportadoras de iones [5]. La regulación debida al campo eléctrico también ha sido observada experimentalmente en hemoproteínas redox. Sin embargo, en esos casos el fenómeno está lejos de estar completamente esclarecido a un nivel molecular [3].

Una mejor comprensión de estos efectos no es sólo esencial desde un punto de vista biológico sino que también puede contribuir al diseño racional de dispositivos bioelectrónicos basados en proteínas para la producción de energía, detección de compuestos y catálisis química. En efecto, la inmovilización de proteínas sobre electrodos ha atraído la atención de la ciencia básica y aplicada por un largo período y está actualmente experimentando un fuerte

renacimiento con la disponibilidad de nuevos materiales nano y mesoscópicos [6, 7]. Sin embargo, incluso bajo condiciones relativamente leves, la inmovilización de proteínas ha sido frecuentemente asociada con un número de efectos colaterales e inesperadas respuestas electroquímicas. Por ejemplo, han sido informado para un número de enzimas y proteínas redox hémicas y no-hémicas cambios conformacionales, intercambio de ligandos, corrimientos de potenciales redox, velocidades inusuales de transferencias electrónicas distancia-dependientes y energías de reorganización alteradas [3, 8, 9, 10].

Es muy probable que, al menos en parte, estos efectos estén relacionados con los fuertes campos eléctricos impuestos en estas interfaces electroquímicas. Sin embargo, discernir los efectos elementales en la matriz proteica y en el grupo hemo ha probado ser experimentalmente muy difícil. En este contexto, la simulación computacional ha provisto información valiosa no accesible por medios experimentales [11].

En el presente trabajo se ha encarado esta cuestión calculando la influencia de un campo eléctrico uniforme sobre modelos de porfirinas de hierro escogidos como análogos de los más comunes sitios activos de proteínas hémicas.

III.1.2. Métodos computacionales y modelos

Como compuestos modelo se han usado porfirinas de hierro con diferentes patrones de coordinación de ligandos que incluyen 5-metilimidazol (*Im*), dimetiltiol (*Met*) y metiltiolato (S^-) como análogos de los residuos de histidina, metionina y cisteína, respectivamente. Oxígeno (O_2), cianuro (CN^-) y monóxido de carbono (CO) fueron también incluidos como ligandos exógenos.

Las combinaciones de ligandos fueron escogidas para imitar las configuraciones de los sitios activos de las hemo-proteínas más comunes como el citocromo c (*MetPorIm*) [12], citocromo c oxidasa (*ImPorIm*, *PorIm* y *O₂PorIm*) [13], citocromo c peroxidasa di-hémica (*MetPorIm* y *ImPorIm*) [14], citocromo c peroxidasa (*PorIm*) [15, 16, 17], citocromo c_3 (*ImPorIm*) [31] y citocromo P450 (*O₂PorS* y *PorS*) [18].

Las energías de disociación de ligandos y los corrimientos de energía de reducción fueron calculados en ausencia y presencia de un campo eléctrico uniforme ortogonal al plano que mejor ajusta al anillo de las hierro porfirinas (*Por*). Para el cálculo de las energías de las reacciones de disociación en presencia de un campo eléctrico, se consideró que los ligandos libres que tienen carga eléctrica nula no están sujetos a la influencia del campo debido a que típicamente no están forzados a residir en las interfases que son fuentes de dicho campo, por lo tanto, son capaces de difundir a regiones en donde el campo eléctrico es débil. Las intensidades de campos eléctricos (F) empleadas en este trabajo rondan entre 0.01 y 0.5

$V\text{\AA}^{-1}$. Todos los cálculos fueron realizados usando el programa SIESTA [19, 20]. Se han empleado pseudo-potenciales estándares que conservan la norma [21] y correcciones parciales de núcleo no lineales [22] para el tratamiento del átomo de hierro. Las funciones de base consisten en orbitales pseudo-atómicos locales (numéricos) proyectados en una grilla sobre el espacio real para calcular los elementos de matriz del potencial de Hartree y del potencial de intercambio y correlación. Para todos los átomos se usaron conjuntos de base de doble polarización con un corrimiento de energía del orbital pseudo-atómico de 25 meV y un corte de grilla de 150 Ry [19]. Los cálculos fueron realizados usando el funcional de aproximación de gradiente generalizado (GGA) propuesto por Perdew et al. [23]. Esta combinación de funcional, conjuntos de base, y parámetros de grilla ya ha sido previamente validada para otros modelos de hemo [24, 25]. Todas las geometrías de las especies calculadas en ausencia y presencia de un campo eléctrico fueron optimizadas en vacío usando una fuerza de tolerancia máxima de $0.02\text{ eV}\cdot\text{\AA}^{-1}$, un alto criterio de convergencia. El estado de espín fundamental de todas las especies fue determinado calculando las energías de los estados de espín bajo, intermedio y alto definidos para una porfirina. En todos los casos, la geometría no cambia significativamente con campos eléctricos inferiores a $0.1\text{ V}\text{\AA}^{-1}$. La raíz de la desviación cuadrática media de las distancias (RMSd) de las estructuras optimizadas dentro del campo con respecto a las mismas en ausencia de éste es usualmente inferior a 0.002 \AA . Los corrimientos máximos en las distancias (Md) son menores a 0.005 \AA . La influencia de los estados redox sobre la geometría es reducida pero más importante que los efectos producidos por el campo eléctrico (El RMSd y Md entre las estructuras de los estados oxidados y reducidos son típicamente menores 0.02 \AA y 0.04 \AA , respectivamente). Sin embargo, en algunos casos como en *COPorIm* y *O₂PorIm* se observan distorsiones significativas en la planaridad del anillo porfirínico en el estado oxidado.

III.1.3. Resultados y Discusión

El efecto de aplicar un campo eléctrico sobre una molécula es la polarización de la molécula. Esto se produce por el desplazamiento de la distribución electrónica que genera un momento dipolar eléctrico inducido (μ^{ind}) a partir del momento dipolar eléctrico permanente (μ^0) que posee la molécula en ausencia del campo. La geometría molecular en una molécula pequeña también se distorsiona pero en menor medida. Por lo tanto, la reorganización de las posiciones nucleares contribuye poco a la polarización de esta molécula. Una molécula de carga eléctrica nula responde ante un campo eléctrico uniforme alineando su dipolo inducido con el vector este campo [26].

Para una molécula fija en el espacio y un campo eléctrico uniforme aplicado a lo largo

del eje z , la magnitud del dipolo inducido en esa misma dirección puede ser expresada como:

$$\mu_z^{ind} = -\frac{\partial E}{\partial F} = \mu_z^0 + \alpha_{zz}F + \frac{1}{2!}\beta_{zzz}F^2 + \dots \quad (\text{III.1.1})$$

donde F es la magnitud del campo eléctrico, E es la energía de la molécula, μ_z^0 es la componente- z del momento dipolar permanente, α_{zz} es la polarizabilidad en la dirección z y β_{zzz} es la hiper-polarizabilidad de primer orden sobre el mismo eje.

De esta manera, ante la interacción con un campo, el cambio en la energía de la molécula queda determinado por:

$$\Delta E^F = E^F - E^0 = -\mu_z^0 F - \frac{1}{2!}\alpha_{zz}F^2 - \frac{1}{3!}\beta_{zzz}F^3 + \dots = -\int_0^F \mu_z^{ind} dF \quad (\text{III.1.2})$$

donde E^F y E^0 son las energías en presencia y ausencia del campo, respectivamente.

Los efectos del campo eléctrico en la termodinámica de una reacción elemental ($A \rightarrow B$) pueden ser evaluados comparando el cambio de energía asociado a la reacción en presencia (ΔE_{AB}^F) y en ausencia (ΔE_{AB}^0) del campo:

$$\Delta\Delta E_{AB}^F = \Delta E_{AB}^F - \Delta E_{AB}^0 = (E_B^F - E_A^F) - (E_B^0 - E_A^0) = \Delta E_B^F - \Delta E_A^F \quad (\text{III.1.3})$$

la cual, de acuerdo con la ecuación III.1.2 se puede reescribir como:

$$\Delta\Delta E_{AB}^F = -\Delta\mu_{z(AB)}^0 F - \frac{1}{2!}\Delta\alpha_{zz(AB)}F^2 - \frac{1}{3!}\Delta\beta_{zzz(AB)}F^3 + \dots \quad (\text{III.1.4})$$

donde $\Delta\mu_{z(AB)}^0 = \mu_{z(B)}^0 - \mu_{z(A)}^0$, $\Delta\alpha_{zz(AB)} = \alpha_{zz(B)} - \alpha_{zz(A)}$ y $\Delta\beta_{zzz(AB)} = \beta_{zzz(B)} - \beta_{zzz(A)}$.

Para distinguir las contribuciones energéticas originadas por los cambios en el momento dipolar permanente (χ_μ) y en el adicional momento dipolar inducido ($\chi_{\alpha\beta}$) definimos:

$$\Delta\Delta E_{AB}^F = \chi_\mu + \chi_{\alpha\beta} \quad (\text{III.1.5})$$

donde $\chi_\mu = -\Delta\mu_{z(AB)}^0 F$ y $\chi_{\alpha\beta} = -\frac{1}{2!}\Delta\alpha_{zz(AB)}F^2 - \frac{1}{3!}\Delta\beta_{zzz(AB)}F^3 + \dots$

Notar que de acuerdo con la ecuación III.1.4, se espera una variación lineal de $\Delta\Delta E_{AB}^F$ con el campo sólo cuando $\chi_{\alpha\beta}$ es despreciable.

En la siguiente discusión reemplazaremos el símbolo AB por R para reducción y por D cuando se refiere a la disociación de un ligando.

Los momentos dipolares de los modelos porfirínicos usados en este trabajo están típicamente orientados a lo largo del eje ortogonal al anillo, escogido como eje- z . Por lo tanto, el

valor absoluto de los cambios energéticos es mayor cuando el vector de campo eléctrico está orientado a lo largo de este eje. El vector del campo aplicado apunta como señala la Figura III.1.1 y las especies están denotadas como L_1PorL_2 .

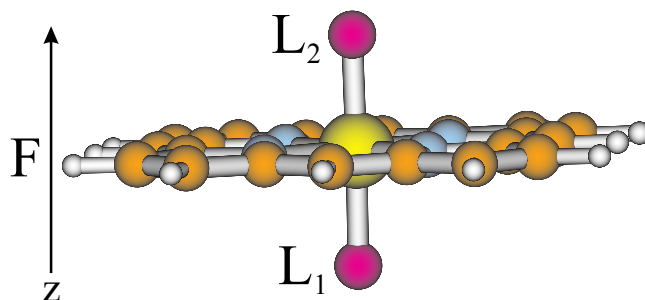


Figura III.1.1: L_1 y L_2 son los ligandos coordinados a la hierro-porfirina. F es la magnitud del campo eléctrico aplicado sobre el eje-z.

III.1.3.1. Efectos del campo eléctrico en potenciales de reducción

Las energías de reducción para las diferentes configuraciones de ligando-porfirina fueron calculadas en ausencia y en presencia de campos variables. Las energías fueron convertidas en pseudo-potenciales de reducción ($V_R = -\frac{\Delta E_R}{F_c}$; $F_c =$ constante de Faraday) y usados para determinar la contribución energética en los corrimientos del potencial de reducción inducidos por la aplicación del campo ($\Delta V_R^F = V_R^F - V_R^0$). La Tabla III.1.1 presenta los valores obtenidos para los diferentes compuestos modelo a fuerzas de campo de $\pm 0.1 \text{ V \AA}^{-1}$, así como la contribución relativa del momento dipolar permanente al corrimiento de potencial (ΔV_μ) como se define en la ecuación III.1.5. Si bien el valor absoluto de V_R no tiene un significado físico real, muestra la tendencia correcta cuando se lo utiliza para comparar con los valores experimentales de las proteínas correspondientes. Por ejemplo, el orden $MetPorIm > ImPorIm > PorIm > PorS$ coincide bien con las observaciones para la forma nativa y no-nativa de los citocromos c y P450 que tienen patrones similares de ligandos coordinados [3, 10]. Los ligandos ricos en electrones tienden a estabilizar la carga del metal en el estado oxidado y por eso bajan el potencial de reducción con respecto a la porfirina de hierro libre en el orden $Por > MetPor > PorIm > CNPor > PorS$. A excepción de O_2Por y $COPor$ que producen el efecto opuesto debido posiblemente a un efecto de retrodonación π significativo. Los complejos modelo hexa-coordinados reflejan la interacción de ambos efectos.

Ante la aplicación de un campo eléctrico perpendicular al plano de la porfirina, el potencial de reducción sufre un corrimiento de magnitud variable dependiendo del patrón de coordinación (Tabla III.1.1).

Tabla III.1.1: Pseudo-potenciales de reducción (V_R), corrimientos del potencial de reducción cuando el campo eléctrico está presente (ΔV_R^F) y la contribución de los cambios en el momento dipolar permanente a ΔV_R^F ($\Delta V_\mu = -\frac{\chi_\mu}{F_c}$) para la reducción de una selección de configuraciones porfirina-ligando. Multiplicidad de espín para la porfirina en el estado inicial (M_i) y final (M_f) del proceso. Unidades de potencial en mV y de F en $V \text{ \AA}^{-1}$. $V = -\frac{E}{F_c}$. F_c = Constante de Faraday.

Reacción de Reducción	V_R	ΔV_R^F		$\Delta V_\mu(F = 0.1)$	M_i	M_f
		$F = -0.1$	$F = 0.1$			
$Por^+ \rightarrow Por$	6334	3	3	2	4	3
$O_2Por^+ \rightarrow O_2Por$	6550	-124	-55	32	2	1
$CNPor \rightarrow CNPor^-$	2738	-84	13	23	2	1
$COPor^+ \rightarrow COPor$	7054	-13	3	12	2	1
$PorS \rightarrow PorS^-$	1884	34	-24	-29	2	1
$PorIm^+ \rightarrow PorIm$	5359	-86	62	73	4	5
$MetPor^+ \rightarrow MetPor$	5895	18	-10	-15	4	3
$O_2PorIm^+ \rightarrow O_2PorIm$	6374	-150	151	66	2	1
$CNPorIm \rightarrow CNPorIm^-$	2352	-75	73	74	2	1
$COPorIm^+ \rightarrow COPorIm$	6302	-62	63	70	2	1
$ImPorIm^+ \rightarrow ImPorIm$	5417	-1	-1	0	2	1
$MetPorIm^+ \rightarrow MetPorIm$	5713	-24	24	24	2	1
$O_2PorS \rightarrow O_2PorS^-$	2623	-137	-142	4	4	1

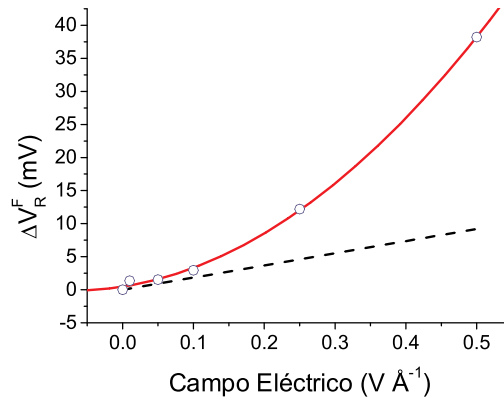


Figura III.1.2: Corrimiento del potencial de reducción (ΔV_R^F) de la porfirina libre (Por) en función del campo eléctrico aplicado. La línea punteada representa la componente del dipolo permanente (ΔV_μ).

Para la porfirina libre los cálculos predicen que ΔV_R^F se encuentra casi completamente dominado por el término polarizable (Figura III.1.2) implicando que corrimientos experimentalmente observables pueden ser sólo esperados para $F > 0.1 V \text{ \AA}^{-1}$.

Por otra parte, todos los modelos de los compuestos penta-coordinados presentan corrimientos más significativos que *Por*, principalmente debido a sus fuertes componentes de $\Delta V_\mu = -\frac{\chi_\mu}{F_c}$ (Tabla III.1.1). Mientras para los ligandos como *CO*, *S⁻*, *Im* y *Met* más del 80 % del corrimiento a $0.1 \text{ V}\text{\AA}^{-1}$ se explica por el término lineal χ_μ , lo opuesto se observa para *CN⁻* y *O₂* que tienen componentes más grandes de $\chi_{\alpha\beta}$. La Figura III.1.3 compara ΔV_R^F para *PorIm* y *MetPor* con el hexa-coordinado *MetPorIm* sobre un amplio rango de fuerzas de campo. *PorIm*, el cual es un modelo de hemo *a₃* de la enzima de membrana citocromo c oxidasa, exhibe una variación lineal del potencial de reducción relativamente fuerte con el campo. La misma exhibe una pendiente de 0.73 \AA debido a una gran variación del momento dipolar permanente que acompaña a la reducción. En contraste, corrimientos más pequeños y no-lineales son predichos para *MetPor*. Como puede anticiparse, la respuesta del campo eléctrico del compuesto hexa-coordinado *MetPorIm* no es una combinación lineal de la respuestas de los dos modelos penta-coordinados, más exactamente refleja la interacción de los dos ligandos que resultan en un único conjunto de parámetros de polarización. Para fuerzas de campo de hasta aproximadamente $0.3 \text{ V}\text{\AA}^{-1}$, *MetPorIm* exhibe una variación lineal de ΔV_R^F con una pendiente a campo cero de 0.24 \AA (Figura III.1.3c) y una variación menor de 0.11 \AA se observa cuando el campo es aplicado paralelo al anillo de la porfirina. Estos resultados están en concordancia con observaciones experimentales anteriores. Cuando el citocromo c se adsorbe electrostáticamente a electrodos metálicos recubiertos de ω -carboxi-alcanotioles, el plano del hemo se orienta aproximadamente perpendicular al plano del metal (el campo eléctrico es paralelo al hemo) y no se observa una variación significativa del potencial de reducción [27]. Por otra parte, corrimientos sustanciales fueron observados cuando la proteína está incrustada en multicapas de clorhidrato de polialilamina / poliestireno sulfonato, presumiblemente debido a la fuerte componente-*z* del campo local dado por la alta densidad de carga del polielectrolito sulfonado y por su habilidad de envolver a la proteína [28].

Para el caso de *ImPorIm*, el potencial de reducción se vuelve altamente insensible al campo aplicado debido a la cancelación del momento dipolar en la dirección *z* (Tabla III.1.1) por la simetría que presenta el sistema sobre este eje. Consistentemente, no se observó experimentalmente corrimiento para el citocromo c coordinado a monocapas autoensambladas de mezcla de alcanotioles que contienen terminaciones de imidazol y piridina cuyo patrón de coordinación de su grupo hemo es análogo a *ImPorIm* [29, 30]. Por otra parte, se encontró por espectroelectroquímica y simulaciones de dinámica molecular que la inmovilización electrostática del citocromo *c₃* en monocapas de alcanotioles carboxi-terminales producen un drástico corrimiento del potencial redox de sus cuatro bis-His hemos [31]. Los efectos fueron atribuidos a la estabilización de las formas férricas en la interfaz del campo eléctrico. El presente resultado muestra que campos homogéneos de magnitudes esperables en este tipo

de interfaces electroquímicas no son suficientes para inducir directamente corrimientos significativos en los potenciales rédox de sus sitios activos. Es más probable, que los corrimientos observados experimentalmente estén relacionados con alteraciones en la electrostática global de la proteína. Estos pueden ser producidos por sutiles cambios estructurales en el estado inmovilizado los cuales son silenciosos al método espectroscópico utilizado aunque se sabe que modulan fuertemente los potenciales rédox.

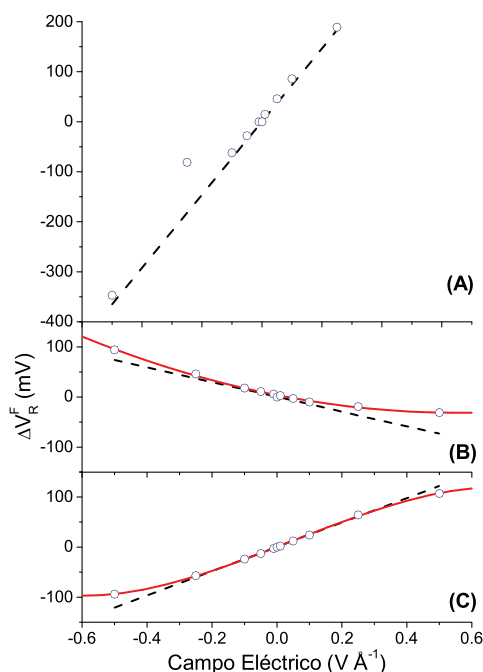


Figura III.1.3: Corrimientos del potencial de reducción (ΔV_R^F) en función del campo eléctrico aplicado. (A) *PorIm*, (B) *MetPor*, (C) *MetPorIm*. La línea punteada representa la componente del dipolo permanente (ΔV_μ).

Los cálculos predicen que la unión de oxígeno molecular al sitio libre *PorIm* para dar *O₂PorIm* (sitio activo de la citocromo c oxidasa) produce el incremento más considerable de la sensibilidad al campo eléctrico del potencial rédox (Tabla III.1.1). Dicho incremento es claramente atribuido al importante cambio en la polarizabilidad que produce el ligando diatómico cuando cambia la carga de la especie a la que está coordinado (como puede verse para *O₂Por*) sumado al efecto lineal de χ_μ atribuido a *Im*. Una conclusión similar puede ser deducida para la unión del oxígeno al sitio activo del citocromo P450 (*O₂PorS*) donde este efecto es casi totalmente producido por $\chi_{\alpha\beta}$. Sin embargo, otros ligandos diatómicos, como el cianuro y el monóxido de carbono, producen un efecto menor en los compuestos modelo *CNPorIm* y *COPorIm* donde la dependencia del campo observada es similar a la de la especie sin estos ligandos (*PorIm*) (Tabla III.1.1).

III.1.3.2. Efectos del campo eléctrico en la afinidad de ligandos

Las energías de disociación de los ligandos individuales, y sus variaciones en presencia de campos homogéneos, fueron calculados para el mismo grupo de porfirinas modelo descritas en la sección anterior, en ambos estados férrico y ferroso. Los resultados obtenidos para intensidades de campo de $\pm 0.1 \text{ V \AA}^{-1}$ aplicados en la dirección z y en ausencia del campo son resumidas en la Tabla III.1.2. Todos los compuestos modelo muestran una significativa variación de las energías de disociación con los campos aplicados ($\Delta\Delta E_D^F$), desde $0.61 \text{ kcal.mol}^{-1}$ para la disociación de *Met* en *MetPorIm*⁺ hasta $7.62 \text{ kcal.mol}^{-1}$ para la disociación de *Im* en *O₂PorIm*. Notar que estos valores de $|\Delta\Delta E_D^F|$ corresponden a variaciones de constantes de equilibrio de disociación por un factor desde aproximadamente 3 hasta 10^6 , respectivamente si los efectos entrópicos y térmicos son despreciados. Para la disociación de *Im* en *O₂PorIm*, las contribuciones de χ_μ y $\chi_{\alpha\beta}$ son comparables. Es destacable como varía la sensibilidad de la reacción con el campo eléctrico cuando éste se aplica en un sentido y en el opuesto.

Tabla III.1.2: Energías de disociación de ligandos (ΔE_D), cambios inducidos por el campo eléctrico ($\Delta\Delta E_D^F$) y contribución energética del cambio en el momento dipolar permanente (χ_μ). Multiplicidad de espín para la porfirina en el estado inicial (M_i) y final (M_f) del proceso. Unidades de energía en kcal.mol^{-1} y de F en V \AA^{-1} .

Reacción de disociación	ΔE_D	$\Delta\Delta E_D^F$		$\chi_\mu(\text{F}=0.1)$	M_i	M_f
		F=-0.1	F=0.1			
<i>MetPor</i> \rightarrow <i>Por</i> + <i>Met</i>	11.79	1.23	-0.98	-1.15	3	3
<i>PorIm</i> \rightarrow <i>Por</i> + <i>Im</i>	7.42	-3.62	3.36	3.49	5	3
<i>MetPor</i> ⁺ \rightarrow <i>Por</i> ⁺ + <i>Met</i>	21.91	0.89	-0.67	-0.77	4	4
<i>PorIm</i> ⁺ \rightarrow <i>Por</i> ⁺ + <i>Im</i>	29.91	-1.57	2.00	1.84	4	4
<i>MetPorIm</i> \rightarrow <i>PorIm</i> + <i>Met</i>	23.06	2.20	-1.48	-1.87	1	5
<i>MetPorIm</i> \rightarrow <i>MetPor</i> + <i>Im</i>	18.68	-2.65	2.85	2.76	1	3
<i>ImPorIm</i> \rightarrow <i>PorIm</i> + <i>Im</i>	26.17	3.85	-3.13	-3.52	1	5
<i>MetPorIm</i> ⁺ \rightarrow <i>PorIm</i> ⁺ + <i>Met</i>	14.90	0.77	-0.61	-0.75	2	4
<i>MetPorIm</i> ⁺ \rightarrow <i>MetPor</i> ⁺ + <i>Im</i>	22.89	-1.68	2.05	1.86	2	4
<i>ImPorIm</i> ⁺ \rightarrow <i>PorIm</i> ⁺ + <i>Im</i>	24.82	1.90	-1.67	-1.84	2	4
<i>O₂Por</i> \rightarrow <i>Por</i> + <i>O₂</i>	13.64	-3.04	-1.46	0.68	1	3
<i>O₂PorIm</i> \rightarrow <i>PorIm</i> + <i>O₂</i>	21.05	-1.00	2.80	0.57	1	5
<i>O₂PorS</i> ⁻ \rightarrow <i>PorS</i> ⁻ + <i>O₂</i>	21.75	-4.52	-1.82	1.50	1	1
<i>O₂PorIm</i> ⁺ \rightarrow <i>O₂Por</i> ⁺ + <i>Im</i>	18.88	-0.97	2.87	2.59	2	2
<i>O₂PorIm</i> \rightarrow <i>O₂Por</i> + <i>Im</i>	14.82	-1.57	7.62	3.38	1	1
<i>COPorIm</i> ⁺ \rightarrow <i>COPor</i> ⁺ + <i>Im</i>	36.86	-1.95	1.49	1.71	2	2
<i>COPorIm</i> \rightarrow <i>COPor</i> + <i>Im</i>	19.53	-3.07	2.87	3.05	1	1
<i>CNPorIm</i> \rightarrow <i>CNPor</i> + <i>Im</i>	20.34	-4.93	3.23	3.47	2	2
<i>CNPorIm</i> ⁻ \rightarrow <i>CNPor</i> ⁻ + <i>Im</i>	11.43	-4.74	4.61	4.65	1	1

La causa de este efecto radica en la importante contribución del término $\chi_{\alpha\beta}$.

Los efectos calculados son predominantemente dominados por los cambios en el momento dipolar permanente que ocurre ante la disociación la cual, a su vez, depende del estado rédox. En consecuencia, la aplicación de un campo puede resultar en aumento o disminución de la energía de disociación, dependiendo del alineamiento del campo y del sentido del cambio en momento dipolar. Este comportamiento es ejemplificado en la Figura III.1.4 para las dos posibles disociaciones de *MetPorIm* en sus dos estados rédox. En la forma férrica, la energía de disociación de *Im* crece con el campo eléctrico con una pendiente a campo cero de $18.6 \text{ kcal.}\text{\AA}.\text{mol}^{-1}\text{V}^{-1}$ y la disociación de *Met* decrece a $-7.5 \text{ kcal.}\text{\AA}.\text{mol}^{-1}\text{V}^{-1}$. Para la forma ferrosa los valores absolutos de las pendientes experimentan un incremento considerable de 27.6 y $-18.7 \text{ kcal.}\text{\AA}.\text{mol}^{-1}\text{V}^{-1}$ para la disociación de *Im* y *Met*, respectivamente. Estas tendencias opuestas implican que aplicar campos suficientemente intensos puede invertir las afinidades relativas de los dos ligandos. Para *MetPorIm* ferroso, se predice que la inversión ocurre a valores de campo de $0.1 \text{ V}\text{\AA}^{-1}$ y para *MetPorIm* férrico cerca de $-0.3 \text{ V}\text{\AA}^{-1}$ (Figura III.1.4a).

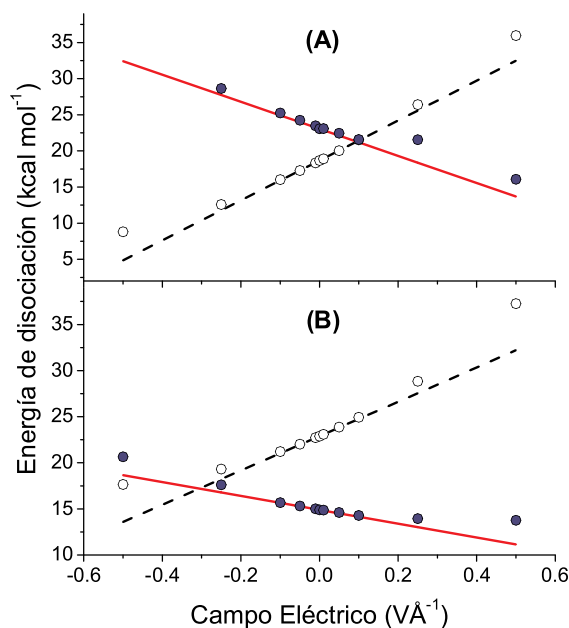


Figura III.1.4: Energías de disociación para *MetPorIm* en función del campo eléctrico aplicado. (A) Reducido, (B) Oxidado. Los círculos vacíos y rellenos corresponden a la disociación de *Im* y *Met*, respectivamente. Las líneas rectas representan el componente correspondiente del dipolo permanente χ_{μ} .

El efecto del campo eléctrico en la disociación de *Por* – *Im* puede atribuirse principalmente a χ_{μ} dado que presenta un importante cambio en el momento dipolar de la reacción

(2.86 *a.u.*). Este cambio es ocasionado por el significativo momento dipolar permanente de la especie *Im*. Este caso es uno de los más destacables debido a que mostró el mayor refuerzo de una unión ($\Delta\Delta E_D^F = 21.1 \text{ kcal.mol}^{-1}$ para $F = 0.5 \text{ V\AA}^{-1}$). Adicionalmente, cuando F es menor que -0.25 V\AA^{-1} la unión de *Por* – *Im* se rompe desapareciendo la existencia de un mínimo local.

Una imagen diferente se obtiene para el compuesto modelo que contiene oxígeno molecular como uno de los ligandos axiales. En ese caso, el efecto del campo eléctrico en la energía de disociación tanto del oxígeno como del sexto ligando deja de estar dominado por el cambio del dipolo permanente y, en cambio, el término de polarizabilidad $\chi_{\alpha\beta}$ gana importancia incluso a campos moderados ($F < 0.1 \text{ V\AA}^{-1}$).

III.1.4. Conclusiones

El presente capítulo muestra que campos eléctricos homogéneos de magnitudes comparables con aquellos encontrados en las membranas biológicas e interfaces electroquímicas pueden tener un impacto sustancial en la reactividad de compuestos modelo de hemo que son escogidos en analogía con los grupos prostéticos de las hemo-proteínas y enzimas rédox más comunes. Cuando campos de 0.1 V\AA^{-1} son aplicados perpendicularmente al plano de la porfirina, se encuentra que inducen corrimientos del potencial de reducción de hasta 150 *mV* y que pueden alterar las constantes de equilibrios de disociación de ligandos por varios órdenes de magnitud, dependiendo del patrón de coordinación.

Estos resultados sugieren que las células pueden ser capaces de modular parámetros cinéticos y termodinámicos de transferencias electrónicas y/o de reacciones enzimáticas, modificando el potencial eléctrico entre sus bicapas lipídicas o alterando el momento dipolar eléctrico de los alrededores del sitio activo de una de estas proteínas. Además, parámetros cinéticos y termodinámicos de reacciones catalizadas por metales podrían ser también controladas por campos eléctricos en electroquímica de películas de proteínas y en dispositivos bioelectrónicos basados en proteínas.

Un estudio más profundo de este problema ciertamente requiere tener en cuenta los efectos del campo eléctrico aplicado en la matriz proteica, así como las interacciones específicas y los campos locales. Cálculos complementarios clásicos y de DFT en proteínas íntegras pueden ayudar a desentrañar una variedad de efectos que se esperan que existan en sistemas más complejos.

III.1.5. Bibliografía

- [1] P. M. De Biase, F. Doctorovich, D. H. Murgida, y D. A. Estrin. Electric field effects on the reactivity of heme model systems. *Chemical Physics Letters*, 434:121–126, 2007.
- [2] A. Messerschmidt, R. Huber, T. Poulos, y K. Wieghardt. *Handbook of Metalloproteins*. John Wiley & Sons, Chichester, 2001.
- [3] D. H. Murgida y P. Hildebrandt. Electron-transfer processes of cytochrome c at interfaces. New insights by surface-enhanced resonance Raman spectroscopy. *Accounts of Chemical Research*, 37:854–861, 2004.
- [4] D. H. Murgida y P. Hildebrandt. Electrostatic-field dependent activation energies modulate electron transfer of cytochrome c. *Journal of Physical Chemistry B*, 106:12814–12819, 2002.
- [5] R. J. Clarke. The dipole potential of phospholipid membranes and methods for its detection. *Advances in Colloid and Interface Science*, 89:263–281, 2001.
- [6] I. Willner y E. Katz. Integration of layered redox proteins and conductive supports for bioelectronic applications. *Angewandte Chemie-International Edition*, 39:1180–1218, 2000.
- [7] E. Katz y I. Willner. Integrated nanoparticle-biomolecule hybrid systems: Synthesis, properties, and applications. *Angewandte Chemie-International Edition*, 43:6042–6108, 2004.
- [8] D. H. Murgida y P. Hildebrandt. Redox and redox-coupled processes of heme proteins and enzymes at electrochemical interfaces. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 7:3773–3784, 2005.
- [9] S. Todorovic, M. M. Pereira, T. M. Bandejas, M. Teixeira, P. Hildebrandt, y D. H. Murgida. Midpoint potentials of hemes a and a(3) in the quinol oxidase from *Acidianus ambivalens* are inverted. *Journal of the American Chemical Society*, 127:13561–13566, 2005.
- [10] S. Todorovic, C. Jung, P. Hildebrandt, y D. H. Murgida. Conformational transitions and redox potential shifts of cytochrome P450 induced by immobilization. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 11:119–127, 2006.
- [11] D. E. Bikiel, L. Boechi, L. Capece, A. Crespo, P. M. De Biase, S. Di Lella, M. C. Gonzalez Lebrero, M. A. Martí, A. D. Nadra, L. L. Perissinotti, D. A. Scherlis, y

- D. A. Estrin. Modeling heme proteins using atomistic simulations. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 8(48):5611–5628, 2006.
- [12] G. W. Bushnell, G. V. Louie, y G. D. Brayer. High-resolution 3-dimensional structure of horse heart cytochrome-c. *Journal of Molecular Biology*, 214:585–595, 1990.
- [13] M. Svensson-Ek, J. Abramson, G. Larsson, S. Tornroth, P. Brzezinski, y S. Iwata. The X-ray crystal structures of wild-type and EQ(I-286) mutant cytochrome c oxidases from *Rhodobacter sphaeroides*. *Journal of Molecular Biology*, 321:329–339, 2002.
- [14] C. J. Ridout, R. James, y C. Greenwood. Nucleotide-sequence encoding the di-heme cytochrome c(551) peroxidase from *Pseudomonas-Aeruginosa*. *Febs Letters*, 365:152–154, 1995.
- [15] D. B. Goodin y D. E. Mcree. The Asp-His-Fe triad of cytochrome-c peroxidase controls the reduction potential, electronic-structure, and coupling of the tryptophan free-radical to the heme. *Biochemistry*, 32:3313–3324, 1993.
- [16] J. E. Erman y L. B. Vitello. Yeast cytochrome c peroxidase: mechanistic studies via protein engineering. *Biochimica et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1597:193–220, 2002.
- [17] J. Kaput, S. Goltz, y G. Blobel. Nucleotide-sequence of the yeast nuclear gene for cytochrome-c peroxidase precursor - functional implications of the pre sequence for protein-transport into mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, 257:5054–5058, 1982.
- [18] B. Meunier, S. P. de Visser, y S. Shaik. Mechanism of oxidation reactions catalyzed by cytochrome P450 enzymes. *Chemical Reviews*, 104:3947–3980, 2004.
- [19] J. M. Soler, E. Artacho, J. D. Gale, A. Garcia, J. Junquera, P. Ordejon, y D. Sanchez-Portal. The SIESTA method for ab initio order-N materials simulation. *Journal of Physics-Condensed Matter*, 14:2745–2779, 2002.
- [20] S. Reich, C. Thomsen, y P. Ordejon. Electronic band structure of isolated and bundled carbon nanotubes. *Physical Review B*, 65:155411, 2002.
- [21] N. Troullier y J. L. Martins. Efficient pseudopotentials for plane-wave calculations. *Physical Review B*, 43:1993–2006, 1991.
- [22] S. G. Louie, S. Froyen, y M. L. Cohen. Non-linear ionic pseudopotentials in spin-density-functional calculations. *Physical Review B*, 26:1738–1742, 1982.

- [23] J. P. Perdew, K. Burke, y M. Ernzerhof. Generalized gradient approximation made simple. *Physical Review Letters*, 77:3865–3868, 1996.
- [24] A. Crespo, M. A. Martí, S. G. Kalko, A. Morreale, M. Orozco, J. L. Gelpi, F. J. Luque, y D. A. Estrin. Theoretical study of the truncated hemoglobin HbN: Exploring the molecular basis of the NO detoxification mechanism. *Journal of the American Chemical Society*, 127:4433–4444, 2005.
- [25] L. Capece, M. A. Martí, A. Crespo, F. Doctorovich, y D. A. Estrin. Heme protein oxygen affinity regulation exerted by proximal effects. *Journal of the American Chemical Society*, 128:12455–12461, 2006.
- [26] P. W. Atkins. *Quanta: a handbook of concepts*, volumen Second. Oxford University Press, Great Britain, 1991.
- [27] D. H. Murgida y P. Hildebrandt. Heterogeneous electron transfer of cytochrome c on coated silver electrodes. Electric field effects on structure and redox potential. *Journal of Physical Chemistry B*, 105:1578–1586, 2001.
- [28] I. M. Weidinger, D. H. Murgida, W. F. Dong, H. Mohwald, y P. Hildebrandt. Redox processes of cytochrome c immobilized on solid supported polyelectrolyte multilayers. *Journal of Physical Chemistry B*, 110:522–529, 2006.
- [29] D. H. Murgida, P. Hildebrandt, J. Wei, Y. F. He, H. Y. Liu, y D. H. Waldeck. Surface-enhanced resonance Raman spectroscopic and electrochemical study of cytochrome c bound on electrodes through coordination with pyridinyl-terminated self-assembled monolayers. *Journal of Physical Chemistry B*, 108:2261–2269, 2004.
- [30] H. Yue, D. Khoshtariya, D. H. Waldeck, J. Grochol, P. Hildebrandt, y D. H. Murgida. On the electron transfer mechanism between cytochrome c and metal electrodes. Evidence for dynamic control at short distances. *Journal of Physical Chemistry B*, 110:19906, 2006.
- [31] L. Rivas, C. M. Soares, A. M. Baptista, J. Simaan, R. E. Di Paolo, D. H. Murgida, y P. Hildebrandt. Electric-field-induced redox potential shifts of tetraheme cytochromes c_3 immobilized on self-assembled monolayers: Surface-enhanced resonance Raman spectroscopy and simulation studies. *Biophysical Journal*, 88:4188–4199, 2005.

III.2

Efecto del campo eléctrico en la coordinación de ligandos a porfirinas

III.2.1. Introducción

En este capítulo se intentará comprobar experimentalmente alguna de las predicciones teóricas del capítulo anterior. Es crucial la elección del sistema a estudiar para poder lograr observar el fenómeno del efecto del campo eléctrico en la reactividad de porfirinas. Para ello es necesario escoger un sistema que sea posible medir y que además presente efectos significativos del campo. Las reacciones de disociación de imidazol son candidatas para este fin dado que son las reacciones más afectadas por el campo, por lo que podrían medirse constantes de equilibrio de estas reacciones a distintos campos eléctricos y correlacionar así el corrimiento de la energía libre estándar de estas reacciones con el valor de campo eléctrico. Otro factor importante es el de maximizar la magnitud del campo eléctrico a aplicar para garantizar el máximo corrimiento del parámetro a observar. Como ya se ha mencionado en la introducción general y como se verá en el próximo capítulo, en la proximidad de la superficie de electrodos sumergidos en una solución conductora es posible obtener altos campos eléctricos debido a que se alcanza una gran caída de potencial en una distancia pequeña. Por lo tanto, las porfirinas a estudiar deben estar adsorbidas sobre los electrodos. Es posible generar monocapas autoensambladas estables sobre la superficie de electrodos de plata u oro con compuestos que contienen tioles que se adsorben químicamente sobre estos metales a través de uniones covalentes fuertes [1, 2]. Para producir monocapas de porfirinas utilizando tioles existen dos posibles estrategias: adsorber moléculas que contienen tioles y luego unir químicamente las porfirinas a los compuestos tiolados inmovilizados [3, 4], o directamente utilizar porfirinas que contienen tioles en su estructura [5]. La primera opción se puede llevar a cabo utilizando la Hemina IX, grupo prostético de numerosas proteínas [6], que posee

dos grupos carboxilato los que se unen covalentemente, por medio de la reacción catalizada de amidación, a los grupos aminos de tioles inmovilizados como la cistamina o cisteamina [1, 2]. Sin embargo, esta opción requiere de más pasos, mayor tiempo de preparación y es más ineficiente que la segunda. En este capítulo, se utilizó la segunda estrategia que tiene la ventaja de que la orientación del anillo de la porfirina puede ser controlada por el número y ubicación de las cadenas laterales introducidas para anclar la porfirina al electrodo sustrato. Se pueden construir monocapas de tetrafenilporfirinas derivatizadas con tioles orientadas de forma perpendicular o coplanar usando uno o cuatro tioles en sus cadenas laterales, respectivamente. En el caso de porfirinas ditioladas, la ubicación de los tioles es el factor dominante que determina su orientación; la porfirina se orientará perpendicularmente si sus tioles están unidos en los grupos fenilos adyacentes, y lo harán coplanarmente si están unidos en los grupos fenilos en una posición diagonal [5]. Tal control estructural fue probado por varios grupos. El primer estudio fue conducido por el grupo de Porter que construyó monocapas de porfirinas de $Co(II)$ con orientaciones perpendicular y coplanar con tetrafenilporfirinas monotioldadas y ditioladas, respectivamente [7]. Otros estudios se han enfocado en el control de la orientación de porfirinas en monocapas como el grupo de Murray que construyó monocapas de porfirinas de $Co(II)$ orientadas coplanarmente [8], Akiyama et al. [9] hicieron monocapas de porfirinas de $Zn(II)$ orientadas perpendicularmente y Shimazu et al. [10] armaron monocapas con porfirinas de $Zn(II)$ orientadas perpendicular y coplanarmente usando porfirinas mono y tetraoladas. Para garantizar que el campo eléctrico en los experimentos fuese perpendicular al anillo de porfirinas se trabajó con monocapas de tetrafenilporfirinas tetraoladas orientadas en forma coplanar al plano de la superficie del electrodo. La aplicación de potenciales en los electrodos de trabajo puede producir cambios redox en las porfirinas adsorbidas que complican el análisis del sistema a estudiar. En este trabajo se utilizaron porfirinas de $Zn(II)$ que poseen un sólo estado redox en una amplia ventana de potencial. Otras de las ventajas de las porfirinas de Zn es que no suelen coordinar compuestos cargados, O_2 y otros ligandos que podrían interferir en las mediciones. Además coordinan sólo una molécula de imidazol [11]. Todas estas características hacen que se reduzca el número de especies que pueden encontrarse en los experimentos simplificando el análisis del sistema en estudio. La baja concentración superficial de moléculas halladas en monocapas de porfirinas (máxima $4 \cdot 10^{-10} \text{ mol.cm}^{-2}$ en porfirinas adsorbidas perpendicularmente [5]) hace que sea muy dificultosa su detección. La técnica SERRS (Surface Enhanced Resonance Raman Scattering) provee una gran sensibilidad para detectar las cantidades ínfimas de porfirinas que se encuentran en una monocapa obteniendo simultáneamente información estructural. La combinación del metal a elegir y la longitud de onda del láser a usar es determinante para obtener una buena amplificación de la señal [12].

En este trabajo se han empleado monocapas de meso-tetra(p-3-tiopropoxifenil)porfina

(*Mes*, porfirina desacetilada) sobre oro que fueron obtenidas a partir de meso-tetra(p-3-acetiltio propoxifenil)porfina (*acMes*, porfirina tioacetilada) (Figura III.2.1, izquierda) y posteriormente fueron caracterizadas a través de técnicas electroquímicas, STM y XPS. Se ha determinado utilizando la técnica SERRS la constante de equilibrio entre Zn(II)-meso-tetra(p-3-tiopropoxifenil)porfina (*ZnMes*) inmovilizada en electrodos de plata y 1-metilimidazol (*1MIm*) (Figura III.2.1, medio) en solución aplicando distintos potenciales eléctricos de forma de someter a la monocapa de porfirinas a distintos campos eléctricos. Posteriormente, se ha medido la constante de equilibrio de coordinación de *1MIm* y Zn(II)-meso-tetra(p-3-acetiltiopropoxifenil)porfina (*acZnMes*, porfirina tioacetilada) (Figura III.2.1, derecha) en solución a través de técnicas de espectroscopía UV-Visible.

III.2.2. Métodos

Las porfirinas fueron sintetizadas a pedido por Frontier Scientific Inc. y el 1-metilimidazol adquirido de Fluka. Estos reactivos fueron usados sin previa purificación.

III.2.2.1. Inmovilización y caracterización

Se utilizó un electrodo de trabajo de oro producido por evaporación sobre vidrio (una película de 250 nm de ancho de oro sobre vidrio "Róbax", AF Berliner glass KG, Alemania¹). El vidrio fue previamente tratado con una película de 2 nm de cromo para obtener una mejor adhesión del oro sobre la superficie del vidrio. Se obtuvieron terrazas de Au(111) a través de un recocido sobre una llama [13]. Se sumergieron los electrodos en una solución de 10 μ M de meso-tetra(p-3-acetiltiopropoxifenil)porfina (*acMes*, porfirina sin metal y acetilada) (Figura III.2.1, izquierda) en cloroformo/etanol (9:1) por más de 24 hs.

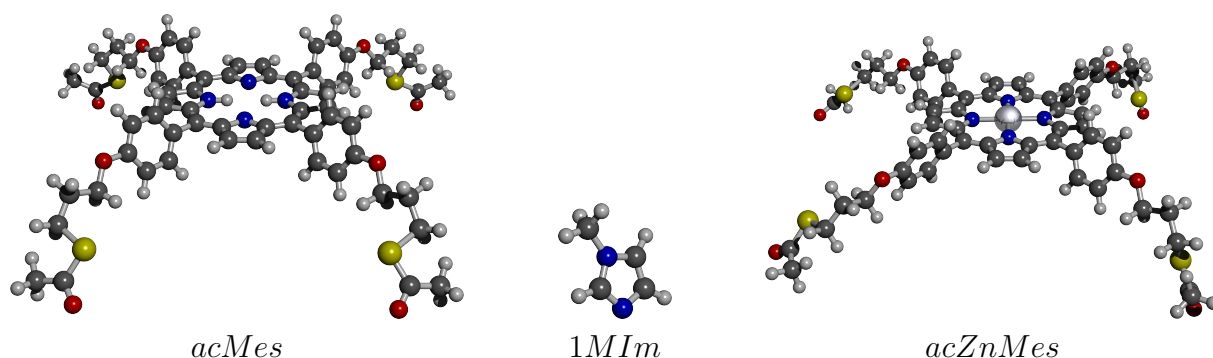


Figura III.2.1: Izquierda: meso-tetra(p-3-acetiltiopropoxifenil)porfina (*acMes*). Medio: 1-metilimidazol (*1MIm*). Derecha: Zn(II)-meso-tetra(p-3-acetiltiopropoxifenil)porfina (*acZnMes*).

¹<http://www.arrandee.com>

La porfirina se adsorbe espontáneamente sobre el metal hidrolizándose la unión tioéster quedando la porfirina covalentemente adsorbida al oro a través del azufre y por otro lado los acetilos quedan también anclados en la superficie [14]. El etanol es adicionado para remover los acetilos adsorbidos. El etanol reacciona con los acetilos dando la formación del correspondiente éster e hidrógeno que pasan a la solución (Figura III.2.2).

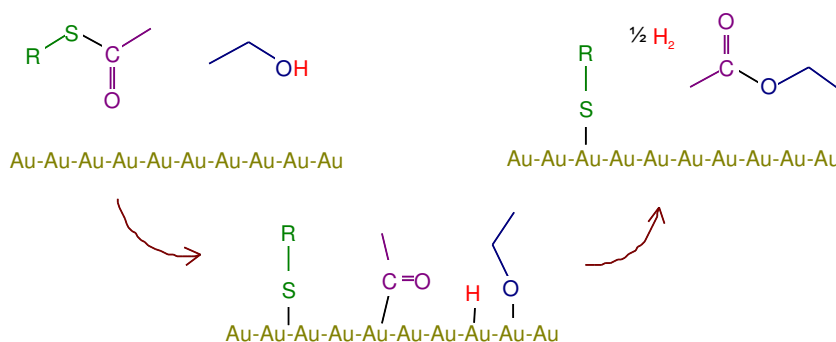


Figura III.2.2: Esquema de la adsorción de un tioéster sobre oro. El etanol agregado reacciona con los acetilos adsorbidos al oro para dar un éster y presumiblemente H_2 que se desprenden de la superficie. El tiol queda unido covalentemente al oro.

Se determinó el recubrimiento del electrodo a través de la desorción electroquímica de 5 electrodos con la porfirina sin metal en una solución de KOH 0.1 M con 3 ciclos de barrido de potencial lineal desde -200 a -1400 mV a 100 mV.seg⁻¹. La celda electroquímica que se utilizó se compone del electrodo de trabajo de oro, un contraelectrodo de platino de mayor superficie que el de trabajo y un electrodo de referencia de $Ag/AgCl$ saturado. Se utilizaron las técnicas de STM y XPS para caracterizar las monocapas de porfirinas en los electrodos de oro que fueron medidos por Mariano Fonticelli y colaboradores en el INIFTA, Universidad Nacional de La Plata.

III.2.2.2. Medición de la constante de equilibrio en superficie

Los experimentos de la medición de constante de equilibrio en superficie se llevaron a cabo a una temperatura de trabajo de $22^\circ C$ en una solución de Bórax ($Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$) 0.05 M a pH 9.2. En estas condiciones de pH , dado el valor de pK_a de 7.2 del $1MIm$, se espera que más de un 99 % de esta especie se encuentre desprotonada. Se trabajó siempre con soluciones purgadas por más de 20 minutos con Ar saturado en vapor de agua (para evitar la evaporación del agua de la solución) y aplicando un flujo del gas inerte saturado en agua en el espacio gaseoso de la celda para evitar el reingreso de O_2 .

La celda electroquímica que se utilizó se compone de un electrodo de trabajo de plata

rugosa en forma de anillo, un contraelectrodo de platino y un electrodo de referencia de $Ag/AgCl$ saturado. Para que en el circuito completo se esté midiendo la capacidad del electrodo de trabajo es necesario que la capacidad del contraelectrodo sea mucho mayor que la del electrodo de trabajo. Para eso se utilizó una lámina de platino rodeando al electrodo de trabajo que supera en más de 20 veces la superficie del electrodo de trabajo.

Los electrodos rugosos se prepararon a partir de electrodos previamente pulidos sumergiéndolos en una solución $0.1 M$ de KCl y $0.1 M$ de $LiClO_4$ y aplicando la secuencia siguiente de potencial $-2V \times 40seg / 0.5V \times 40seg / -0.5V \times 40seg / 0.5V \times 15seg / -0.5V \times 15seg / 0.5V \times 15seg / -0.5V \times 30seg / -0.4 \times 300seg$ de la cual se obtienen electrodos con menor cantidad de $AgCl$ depositado en los electrodos que en los protocolos convencionales sin $LiClO_4$ [15].

La inmovilización de $Zn(II)$ -meso-tetra(p-3-acetiltiopropoxifenil)porfina ($acZnMes$) (Figura III.2.1, derecha) en los electrodos de plata se realizó sumergiendo un electrodo rugoso en una solución $10\mu M$ de $acZnMes$ (Mr : $1158.78 g.mol^{-1}$) en cloroformo-etanol 9:1 por más de 24 hs. Posteriormente, se enjuagó el electrodo numerosas veces con cloroformo dejándolo luego almacenado en cloroformo hasta el momento de su uso en el mismo día.

Se hizo girar el electrodo de trabajo durante las mediciones de manera de evitar la sobreexposición al láser para reducir la fotodescomposición de la muestra. La longitud de onda del láser utilizado fue de $413.138 nm$ y la potencia de haz que incide sobre la celda fue de $150 \mu W$.

Se determinaron constantes de equilibrio a los potenciales -500 , -250 y $0 mV$ aplicados respecto al electrodo de referencia. Cada espectro SERRS se tomó acumulando por 10 segundos y promediando 2 acumulaciones. Se utilizó un rejilla con 1800 rendijas y un binning de 1. El alineamiento del equipo Raman se realizó maximizando la señal de una referencia de silicio. Se calibró el espectrómetro utilizando la línea de $435.833 nm$ de la luz de mercurio.

Se tomaron espectros a distintas concentraciones de 1-metilimidazol ($1MIm$) (Mr : $82.11 g.mol^{-1}$). El $1MIm$ fue inyectado a la celda de trabajo con jeringas Hamilton a partir de una solución $0.8 M$ de $1MIm$ en buffer bórax o a partir de $1MIm$ líquido puro (densidad: $1.030 g.ml^{-1}$). Luego de cada adición de $1MIm$ se purgó la solución por 5 min con Ar para acelerar la homogeneización de la solución. Las determinaciones de las constantes de equilibrio se realizaron para 5 electrodos distintos a cada potencial aplicado.

Con la combinación de la utilización de electrodos rugosos de plata y la longitud de onda del láser de $413.138 nm$ se obtiene una máxima intensificación SERRS de la porfirina inmovilizada. Esto se debe a que con esta combinación se obtiene una excelente intensificación SERS dada por la eficiente excitación de los plasmones superficiales. Simultáneamente, el láser excita a la porfirina en la banda de máxima absorción (banda de Soret) por lo que se obtiene una alta intensificación Raman Resonante.

El análisis de datos utilizado para hacer la determinación de las constantes de equilibrio a cada potencial se explica en los resultados.

III.2.2.3. Medición de constante de equilibrio en solución

Estas porfirinas son solubles sólo en solventes no polares como cloroformo, diclorometano, cloruro de metilo, tetrahidrofurano, tolueno y benceno; no son solubles en agua, alcoholes, acetonitrilo, acetona, dimetilsulfóxido, tetracloruro de carbono, hexano ni dimetilformamida. A una solución de $2.78 \cdot 10^{-6} M$ de Zn(II)-meso-tetra(p-3-acetiltiopropoxifenil)porfina (*acZnMes*) (Figura III.2.1, derecha) en cloroformo contenida en una cubeta de cuarzo de 1 cm de paso óptico se le agregó cantidades sucesivas de 1-metilimidazol midiendo los cambios espectrales en la zona visible con un espectrofotómetro UV-Visible HP8453. Se mantuvo una agitación constante de la solución. Luego del agregado de 1 *MIm* se dejó homogeneizar la solución antes de tomar cada espectro UV-Visible. Se trabajó en atmósfera inerte. El equilibrio se alcanza rápidamente dado que tanto la reacción de asociación como disociación son extremadamente veloces [16, 17].

III.2.3. Resultados y Discusión

III.2.3.1. Inmovilización y caracterización

Se inmovilizó a *Mes* sobre electrodos de Au como se explica en los métodos. De la función de intensidad de corriente (obtenida por voltametría cíclica) respecto al tiempo se calculó el área entre el pico de desorción y una línea recta tangente a los mínimos de la onda, que corresponde al pasaje de carga durante la desorción (Figura III.2.3) [18]. Suponiendo que la porfirina se adsorbe a través de sus cuatro tioles, entonces cuatro unidades de carga elemental corresponden a una molécula de porfirina desorbida. La onda de desorción se obtuvo en promedio a $-958 \pm 9 mV$. Se procedió de esta forma para los 5 electrodos analizados obteniendo un valor medio de $4.8 \cdot 10^{-12} mol.cm^{-2}$ de porfirina desorbida respecto del recubrimiento máximo estimado de $2.6 \cdot 10^{-11} mol.cm^{-2}$ obtenido a partir de las dimensiones (aproximadamente de 25 x 25 Å) de la porfirina.

Por medio de la técnica XPS se observó la presencia de C, O, S y N sobre la superficie de electrodos de Au en proporciones consistentes con la composición de *Mes*. En las imágenes obtenidas por STM se pueden observar círculos de color más claro que corresponden a *Mes* adsorbida sobre la superficie del oro (Figura III.2.4). En la Figura se puede observar a la izquierda la escala de colores que indican la altura relativa de los elementos de la imagen de la derecha.

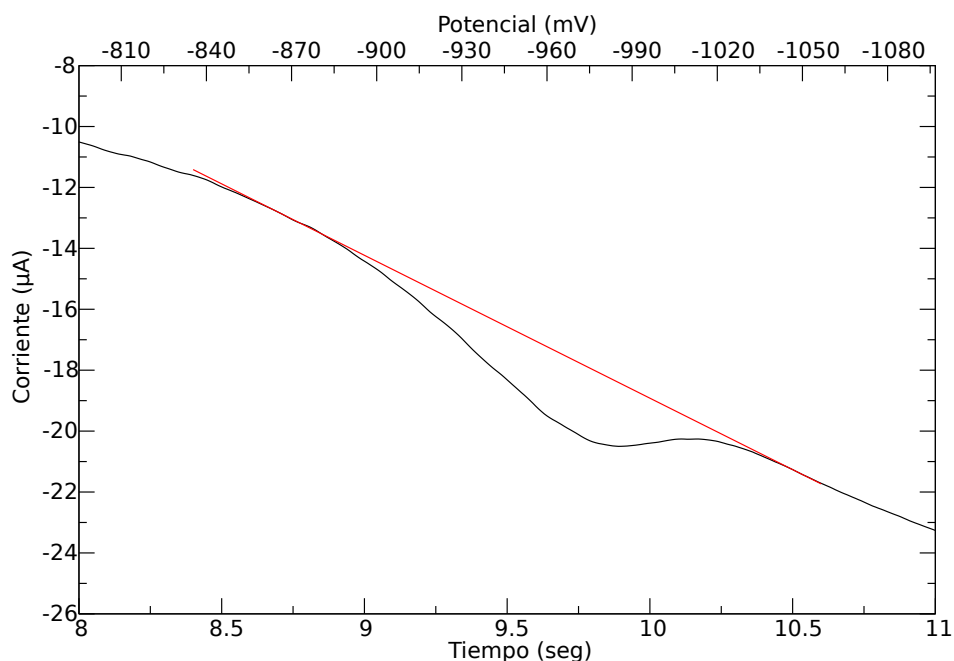


Figura III.2.3: Desorción de *Mes* en electrodo de Au en 0.1 M KOH.

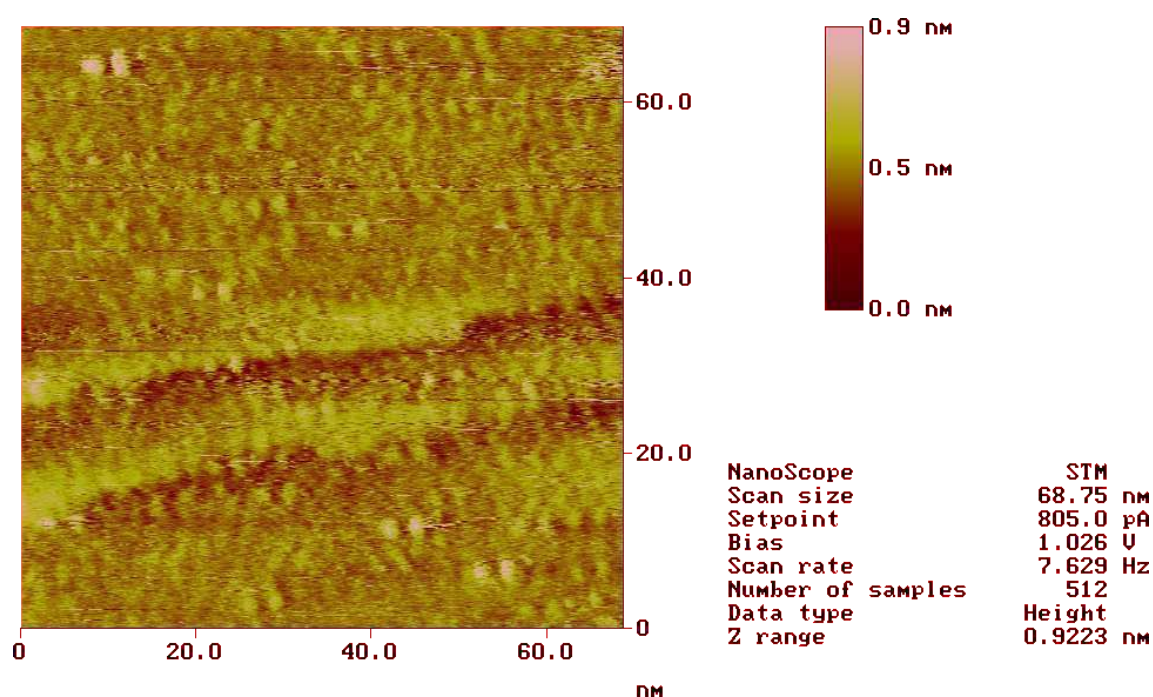


Figura III.2.4: Imágenes obtenidas por STM de *Mes* adsorbida sobre los electrodos de Au.

A través de estas imágenes se pudo obtener un diámetro promedio estimado para las porfirinas de $23.8 \pm 3.6 \text{ \AA}$ muy cercano al observado para otra tetrafenilporfirina similar [19, 20]. A partir de una imagen de STM correspondiente a un área superficial de 50 x 50 nm se

podieron contar 78 moléculas de porfirina. Con estos datos se puede estimar un recubrimiento de $5.2 \cdot 10^{-12} \text{ mol.cm}^{-2}$. Utilizando la distancia de máximo acercamiento entre los centros de dos porfirinas de 30 Å se pudo estimar un recubrimiento máximo de $2.0 \cdot 10^{-11} \text{ mol.cm}^{-2}$. Estos datos son totalmente consistentes con los obtenidos a partir de técnicas electroquímicas. Dado el diámetro de las porfirinas es posible inferir que las porfirinas se disponen de manera paralela a la superficie como era esperable según la cantidad y disposición de los sustituyentes tiolados. Esto mismo también fue observado a partir imágenes de STM de mejor resolución para tetrafenilporfirinas sobre Ag y Au [14, 19]. A partir del recubrimiento determinado y del máximo recubrimiento estimado es posible estimar que sólo un 33 % de la superficie del electrodo se recubre con la porfirina. Esto probablemente se deba a que las porfirinas se adsorben de manera desordenada utilizando ineficientemente el área del electrodo. Las porfirinas se van uniendo covalentemente al oro a medida que van haciendo contacto con la superficie. El reordenamiento molecular se ve impedido por las uniones covalentes S-Au que mantienen ancladas a las porfirinas.

III.2.3.2. Medición de la constante de equilibrio en superficie

Con el fin de estudiar la dependencia de la constante de equilibrio de coordinación de $1MIm$ a $ZnMes$ con el campo eléctrico se aplicaron distintos potenciales eléctricos a los electrodos. Las constantes de equilibrio se determinaron tomando distintos espectros SERRS de $ZnMes$ inmovilizada sobre la superficie de electrodos rugosos de plata. Los espectros fueron obtenidos a medida que se fue agregando $1MIm$ a la solución acuosa regulada a pH 9.23 donde se encuentra inmerso el electrodo. Sólo fue posible utilizar agua como solvente debido a que los materiales que componen la celda de trabajo son sensibles a solventes orgánicos.

La intensidad Raman (I) obtenida es proporcional a la cantidad de moléculas adsorbidas sobre la superficie por unidad de área (n) que son excitadas por el láser (ecuación III.2.1) [21, 22]:

$$I = k.n \quad (III.2.1)$$

donde k es una constante de proporcionalidad. A medida que se agrega imidazol a la solución el índice de refracción del medio cambia por lo que también cambia la posición del foco del haz enfocado a través de las lentes sobre la superficie. Esto produce que cambie la intensidad del haz y área del electrodo excitado por lo que produce que la constante de proporcionalidad k varíe dificultando la determinación de la concentración superficial de porfirinas.

Para la reacción de coordinación en equilibrio con su disociación (ecuación III.2.2):



se planteó la constante de equilibrio K_{sup} entre las especies en superficie y en solución:

$$K_{sup} = \frac{n_{1MIm-ZnMes}}{[1MIm] \cdot n_{ZnMes}} \quad (III.2.3)$$

donde n es la cantidad de moléculas adsorbidas por unidad de área y $[1MIm]$ representa a la concentración molar del imidazol en la solución. Es difícil determinar n a partir de I dado que esta última varía considerablemente en cada medición, por esta razón es conveniente utilizar el parámetro θ definido como la fracción molar de $ZnMes$ (ecuación III.2.4).

$$\theta = \frac{n_{ZnMes}}{n_{1MIm-ZnMes} + n_{ZnMes}} \quad (III.2.4)$$

Reescribiendo la ecuación III.2.3 en función de θ se obtiene la ecuación III.2.5. Si se la reordena resulta en la isoterma de Langmuir (ecuación III.2.6) [23, 24, 25, 26, 27].

$$K_{sup} = \frac{1 - \theta}{\theta \cdot [1MIm]} \quad (III.2.5)$$

$$\theta = \frac{1}{K_{sup}[1MIm] + 1} \quad (III.2.6)$$

Por lo tanto, determinando θ y conociendo la concentración de $1MIm$ se obtiene la constante de equilibrio buscada (K_{sup}). Dado que la cantidad de porfirina en la superficie es muy pequeña en comparación con la cantidad de moléculas de imidazol en la solución entonces la concentración analítica de $1MIm$ es muy próxima a su concentración una vez alcanzado el equilibrio de coordinación. Los espectros SERRS medidos a las distintas concentraciones de $1MIm$ a 0 mV se muestran en la Figura III.2.5. Puede verse que a medida que se agrega el soluto el espectro de la porfirina se modifica indicando que $1MIm$ se coordina a $ZnMes$. Previamente, se comprobó utilizando un electrodo libre de porfirina que el $1MIm$ no muestra señal en el espectro SERRS. En la Figura III.2.6 se muestra el corrimiento hacia la izquierda de la banda más intensa de la porfirina a 1350 cm^{-1} como consecuencia del agregado de imidazol.

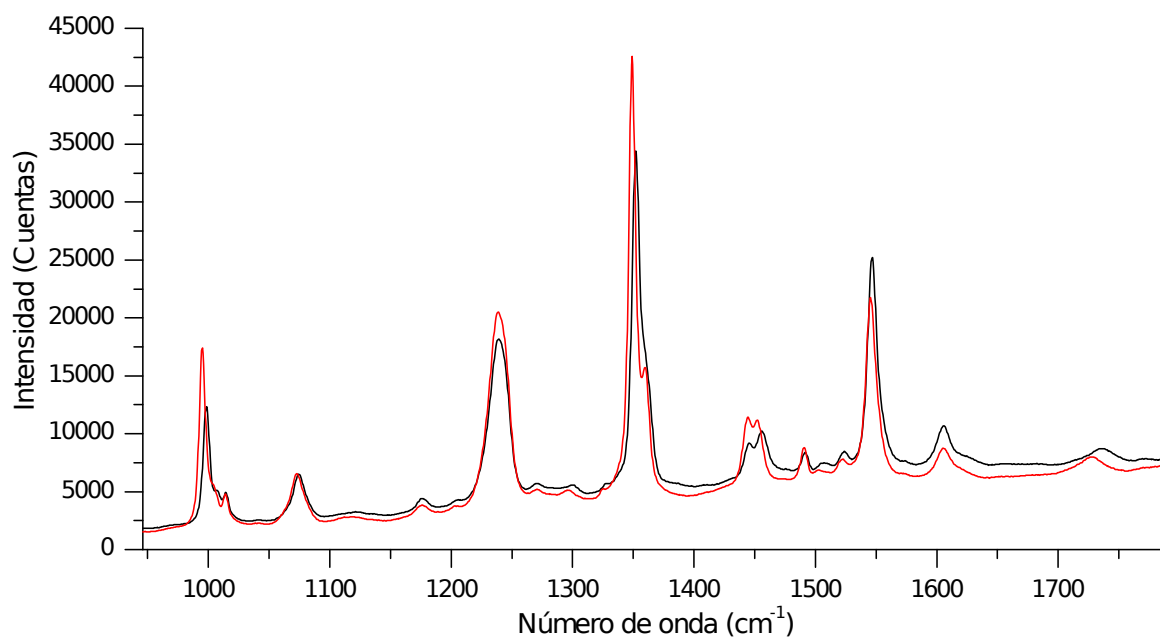


Figura III.2.5: Espectro SERRS de *ZnMes* (negro) y *1MIm-ZnMes* (rojo) inmovilizados sobre plata rugosa a 0 mV de potencial aplicado.

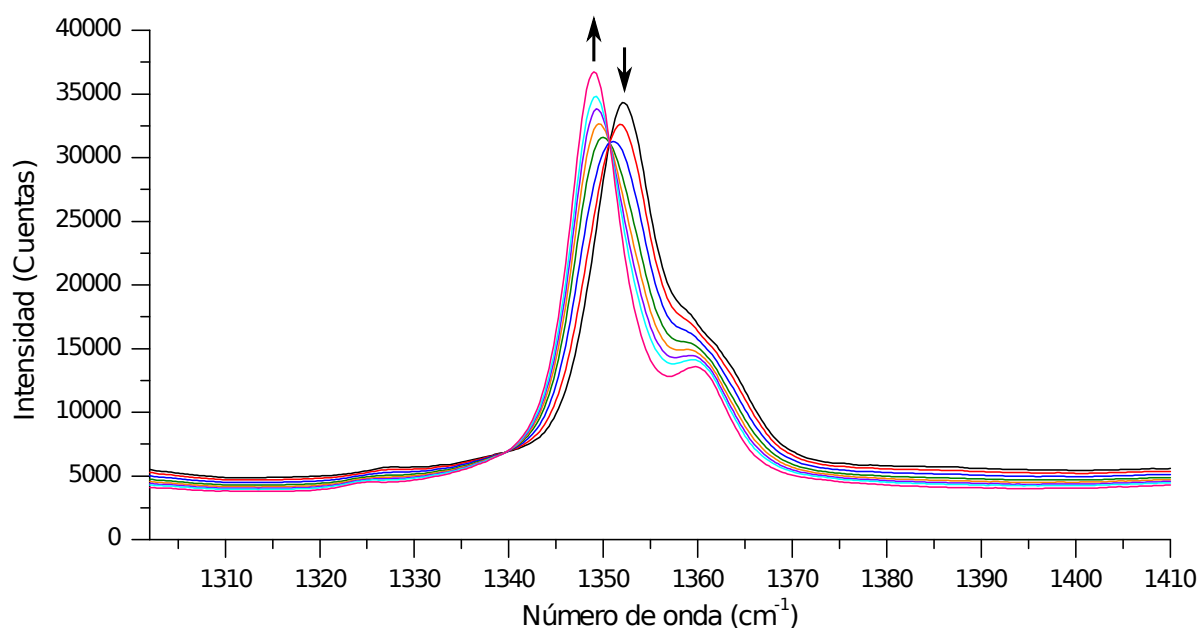


Figura III.2.6: Espectro SERRS de la porfina inmovilizada sobre plata rugosa a cada concentración de *1MIm*.

Como ya ha sido mencionado, se requiere determinar θ a partir de estos datos espectrales. El espectro observado ($I(\nu)$) debe ser una combinación lineal de los espectros de *ZnMes* y *1MIm-ZnMes* según lo indica la ecuación III.2.7. La intensidad I medida para cada

número de onda ν depende de la proporción de $ZnMes$ (θ), la intensidad de $ZnMes$ y $1MIm - ZnMes$ y un factor de proporcionalidad f . Entonces si podemos determinar la intensidad de $ZnMes$ relativa a la de $1MIm - ZnMes$ se podrán ajustar a cada uno de los espectros los parámetros a y b que son las cantidades relativas de cada una de las especies de porfirina que dependen de f y θ , y con θ y $[1MIm]$ obtener la constante de equilibrio buscada (ecuación III.2.7).

$$I(\nu) = a.I_{ZnMes}(\nu) + b.I_{1MIm-ZnMes}(\nu), \quad a = f.\theta, \quad b = f(1 - \theta) \quad (III.2.7)$$

Este análisis es posible realizarlo como se explica en los métodos generales (sección II.1.3) a través de una descomposición de la matriz de datos en sus valores singulares. Se armó la matriz de datos A utilizando el espectro comprendido entre 1302 y 1410 cm^{-1} dado que en esta zona espectral se encuentra la banda más intensa que sufre un importante corrimiento. La matriz A contiene en los elementos de cada columna los valores de intensidad de cada espectro tomado. Cada espectro se corresponde con una dada concentración de $1MIm$ que va desde 0 a 0.4 M . Cada elemento de la fila corresponde al valor de intensidad medida a cada número de onda. Se tuvieron en cuenta las diluciones producidas por el aumento del volumen al agregar las alícuotas de las soluciones de $1MIm$.

Se pudo determinar que los espectros medidos sólo tienen dos componentes principales que están relacionados con los espectros de $ZnMes$ y de $1MIm - ZnMes$. Se reconstruyó la matriz de datos a partir de las dos primeras columnas de las matrices *hanger* (U_c) y *aligner* (V_c) y de los dos primeros elementos diagonales del *stretcher* (Σ_c). La matriz de datos reconstruida sin los componentes secundarios (A') coincidió con elevada exactitud con la matriz de datos original (A), confirmando que los espectros tomados son combinación lineal de estas dos componentes principales. Se construyó la matriz rotacional R de forma tal de transformar U_c , V_c y Σ_c (como se explica en los métodos generales, sección II.1.3) en una matriz formada por la intensidad a cada número de onda de cada especie ($ZnMes$ y $1MIm - ZnMes$) (E) y otra matriz con las cantidades relativas de cada una de estas especies (a y b) para cada concentración de $1MetIm$ (C) (ecuaciones III.2.8, III.2.9 y III.2.10).

$$A' = EC \quad (III.2.8)$$

$$E = U_c \Sigma_c R \quad (III.2.9)$$

$$C = R^{-1} V_c^T \quad (III.2.10)$$

Dado que sólo se consideraron 2 componentes principales, la dimensión de R es de 2 x 2.

Se obtuvo una primera aproximación de la matriz R construyendo una matriz E utilizando como vectores columna la intensidad para cada ν de $ZnMes$ y $1MIm - ZnMes$ (ecuación III.2.11).

$$R = \Sigma_c^{-1} U_c^T E \quad (\text{III.2.11})$$

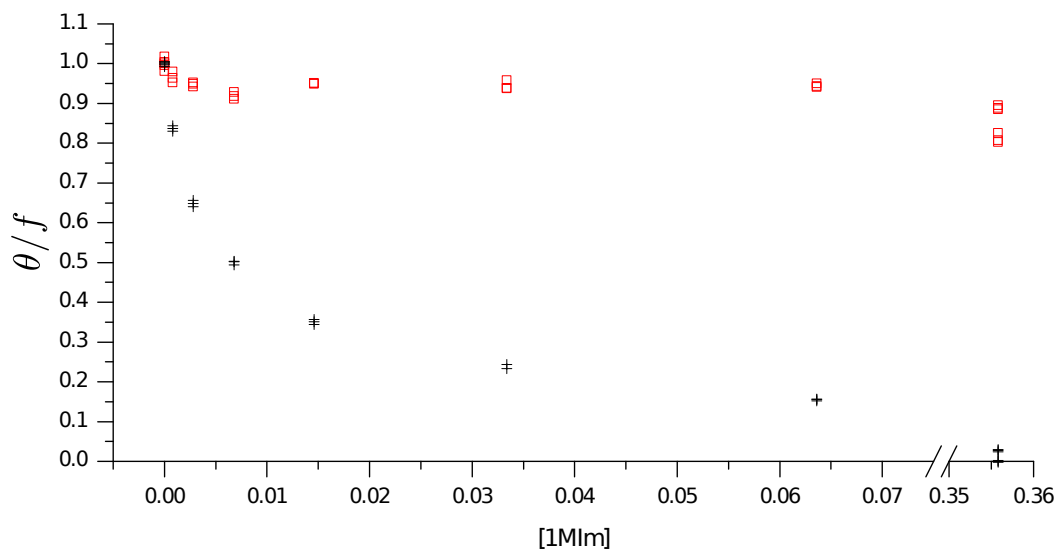


Figura III.2.7: Valores de θ (negro) y f (rojo) en función de $[1MIm]$ obtenidos a 0 mV.

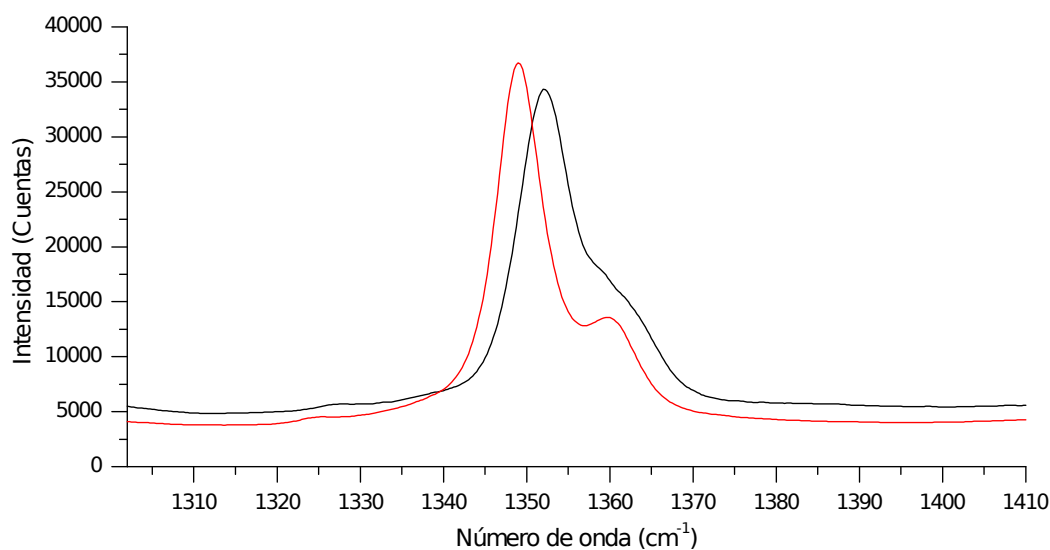


Figura III.2.8: Espectro SERRS de la banda de 1350 cm^{-1} de $ZnMes$ (negro) y $1MIm - ZnMes$ (rojo) inmovilizados sobre plata rugosa a 0 mV de potencial aplicado. Corresponden a los vectores columna de la matriz E .

Se utilizó para estimar el vector $I(\nu)$ de $ZnMes$ el promedio de los espectros a concentración nula de $1MIm$ y para el de $1MIm - ZnMes$ el promedio de los espectros tomados a la mayor concentración de imidazol. El equilibrio a esta concentración de $1MIm$ está casi completamente desplazado hacia $1MIm - ZnMes$. De esa forma se obtiene R con la cual se determina E cuyos vectores columna $I(\nu)$ se grafican en la Figura III.2.8. Los vectores fila de la matriz C contienen los valores de a y b para cada $[1MIm]$. Los valores de θ y f para cada $[1MIm]$ se obtienen a partir de estos parámetros con las ecuaciones III.2.12 y III.2.13, y se grafican en la Figura III.2.7.

$$\theta = \frac{a}{a+b} \quad (III.2.12)$$

$$f = a + b \quad (III.2.13)$$

Puede observarse en la Figura III.2.7 que f varía a medida que se va agregando imidazol. Esto se debe en parte la fotodegradación de la muestra y, como se explicó antes, a la variación del índice de refracción de la solución que corre la distancia focal del haz haciendo que la intensidad absoluta varíe, por lo que se tiene una incerteza en la relación de intensidades entre el espectro de $ZnMes$ y $1MIm - ZnMes$. La variación de f para las mediciones a la misma concentración de $1MIm$ se deben a las fluctuaciones en la potencia del láser.

La ecuación III.2.6 se puede reescribir dando lugar a la ecuación III.2.14. Entonces si los datos obtenidos utilizando SVD se grafican como $\ln\left(\frac{1-\theta}{\theta}\right)$ versus $\ln([1MIm])$ debería obtenerse una recta de pendiente 1 y la ordenada al origen correspondería al logaritmo natural de la constante de equilibrio buscada.

$$\ln\left(\frac{1-\theta}{\theta}\right) = \ln([1MIm]) + \ln(K_{sup}) \quad (III.2.14)$$

Esto se representa en la Figura III.2.9. Puede observarse que la recta de pendiente uno no ajusta a los datos (Figura III.2.9, línea azul), sin embargo, cuando se deja libre la pendiente el ajuste es muy bueno (Figura III.2.9, línea roja). Esto sucede para todos los electrodos medidos a los distintos potenciales aplicados, lo que significa que el modelo simple de una constante de equilibrio única no es consistente con lo que está sucediendo en realidad. Se han probado distintos modelos donde se considera más de un equilibrio y otras isothermas que consideran otros factores sin éxito. La relación empírica obtenida es totalmente consistente con la ecuación linealizada (ecuación III.2.15) de la isoterma de Langmuir-Freundlich (ecuación III.2.16)

$$\ln\left(\frac{1-\theta}{\theta}\right) = n \cdot \ln([1MIm]) + n \cdot \ln(K_{sup}) \quad (III.2.15)$$

$$\theta = \frac{1}{K_{sup}^n [1MIm]^n + 1} \quad (\text{III.2.16})$$

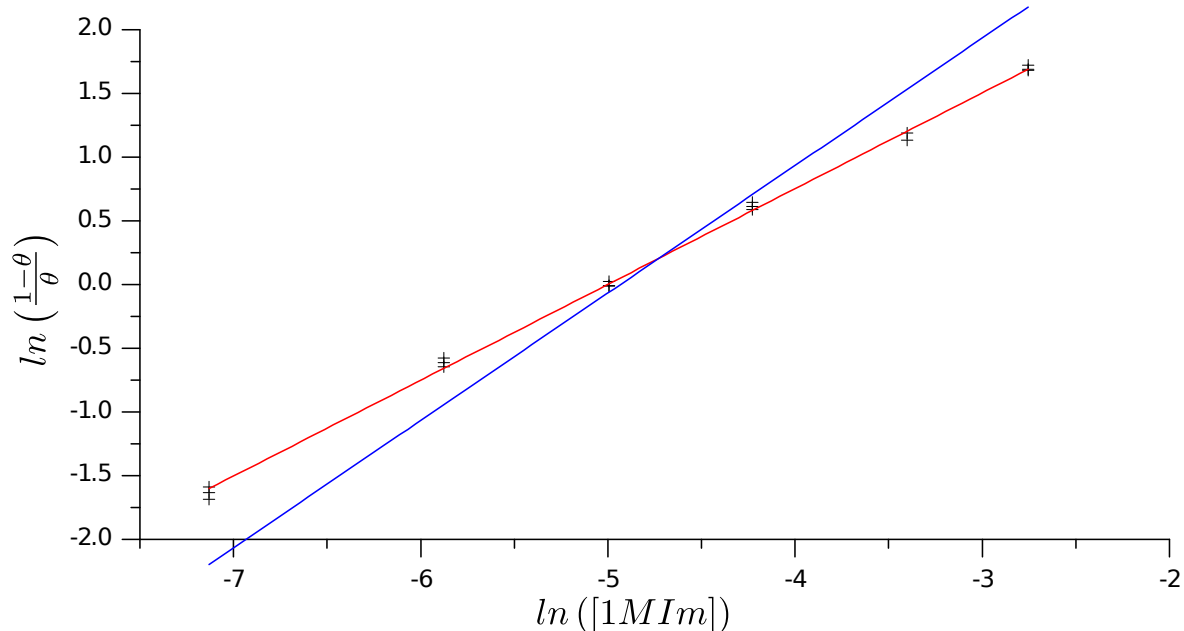


Figura III.2.9: $\ln\left(\frac{1}{1-\theta}\right)$ versus $\ln([1MIm])$ (negro) para los datos a 0 mV. Isotherma de Langmuir linealizada (azul). Isotherma de Langmuir-Freundlich linealizada (rojo).

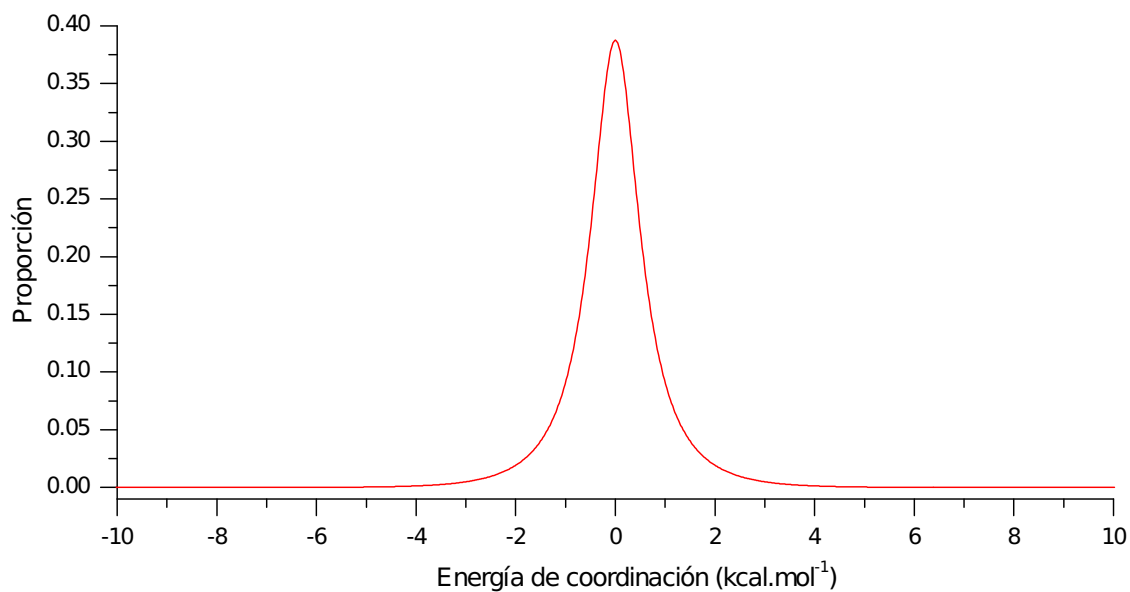


Figura III.2.10: Función de distribución de la energías de coordinación que considera la isoterma de Langmuir-Freundlich.

El modelo detrás de esta isoterma presupone que existen sitios de unión con distintas energías de coordinación distribuidas según una función de densidad pseudo-gaussiana (ecuación III.2.17) la cual se grafica en la Figura III.2.10 [23, 24, 25, 26, 27].

$$\chi(\Delta E) = \frac{\text{sen}(\pi n) e^{n \frac{\Delta E}{RT}}}{\pi \left[e^{2n \frac{\Delta E}{RT}} + 2 \cos(\pi n) e^{n \frac{\Delta E}{RT}} + 1 \right]} \quad (\text{III.2.17})$$

Siendo el parámetro n menor o igual a 1 y se relaciona con el ancho de la función de densidad. Cuando n se acerca a 1 la función tiende a un delta de Dirac aproximándose a la isoterma de Langmuir que considera que la energía de coordinación es única. El ancho de energía de la función, o sea, su desviación estándar (σ) se calcula con la ecuación III.2.18 y da una idea de cuánto es la dispersión de los estados energéticos alrededor de la energía libre estándar promedio de la reacción que se obtiene a partir de $K_{sup}(= e^{-\frac{\Delta G^\circ}{RT}})$.

$$\sigma^2 = \int_{-\infty}^{\infty} \Delta E \chi(\Delta E) dE \quad (\text{III.2.18})$$

La isoterma de Langmuir-Freundlich se obtiene a partir de la integración del producto de la función de distribución (ecuación III.2.17) con la isoterma de Langmuir local (ecuación III.2.19) representada en la ecuación III.2.20.

$$\theta_l([1MIm], \Delta E, K_{sup}) = \frac{1}{1 + K_{sup} e^{\frac{\Delta E}{RT}} [1MIm]} \quad (\text{III.2.19})$$

$$\theta([1MIm], n, K_{sup}) = \int_{-\infty}^{\infty} \theta_l([1MIm], \Delta E, K_{sup}) \chi(\Delta E, n) dE \quad (\text{III.2.20})$$

Es razonable el hecho de considerar que las moléculas de imidazol no se coordinan a la porfirina adsorbida con la misma energía dado que la superficie del electrodo rugoso de plata es muy irregular por lo que también lo debe ser la disposición y geometría de las porfirinas adsorbidas.

Conociendo ahora el modelo de isoterma que mejor ajusta a los datos para poder obtener la constante de equilibrio promedio de la reacción, se deben analizar las consecuencias que ocasionan el hecho de que la intensidad relativa real de $ZnMes$ y $1MIm - ZnMes$ sea desconocida y variable en cada medición. Considérese que en la ecuación III.2.7, la intensidad relativa de la porfirina coordinada real es igual a la intensidad relativa medida de $1MIm - ZnMes$ multiplicada por un factor de corrección r obteniéndose la ecuación III.2.21.

$$I(\nu) = a.I_{ZnMes}(\nu) + b.r.I_{1MIm-ZnMes}^{exp}(\nu) \quad (\text{III.2.21})$$

Al calcular en este caso θ , que lo llamaremos para diferenciar θ' , se obtiene un diferente valor en función de los parámetros a y b reales según se muestra la ecuación III.2.22.

$$\theta' = \frac{a}{a + r.b} \quad (\text{III.2.22})$$

Al calcular la constante de equilibrio en este caso (K'_{sup}) se obtiene que se relaciona con n , K_{sup} y r según la ecuación III.2.23.

$$K'_{sup} = r^{\frac{1}{n}} K_{sup} \quad (\text{III.2.23})$$

Por lo que según como varíe la relación de intensidades de los espectros iniciales y finales, o sea, el valor r obtendríamos un valor distinto en la constante de equilibrio medida por lo que hay establecer una estandarización para que la constante de equilibrio medida sea comparable con todas las otras medidas entre si. Si se calcula la integral entre la señal principal a 1350 cm^{-1} y una recta tangente que pase por los mínimos alrededor de la señal se obtiene que es aproximadamente igual antes e inmediatamente después de agregar el imidazol en exceso para desplazar el equilibrio hacia la porfirina coordinada. Esto se hizo ajustando el foco para maximizar la señal antes y después del agregado de imidazol para corregir el efecto del corrimiento del foco por el cambio del índice de refracción. Por lo tanto, para evitar este error en la constante de equilibrio producido por la variabilidad de las intensidades relativas entre el primer y último espectro, se ajustaron los vectores columna de la matriz E de forma tal que la integral entre los espectros de la porfirina y la porfirina coordinada fueran iguales.

Se procedió de esta forma para calcular las constantes de equilibrio medidas para los distintos potenciales de electrodo. En la Tabla III.2.1 se muestra el promedio de estas constantes de equilibrio, el parámetro n y la desviación estándar de la distribución de estados energéticos (σ), y la energía libre estándar de la reacción de coordinación (ΔG°).

Tabla III.2.1: Valores promedio de la constante de equilibrio (K_{sup}), n , σ y ΔG° de la reacción de coordinación obtenidas a 0, -250 y -500 mV vs. Ag/AgCl saturado .

Potencial (mV)	K_{sup}	$\Delta G^\circ (kcal.mol^{-1})$	n	$\sigma (kcal.mol^{-1})$
0	152 ± 3	-2.948	0.774 ± 0.009	1.16
-250	128 ± 14	-2.847	0.822 ± 0.012	0.96
-500	123 ± 23	-2.826	0.715 ± 0.060	1.39

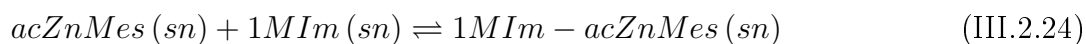
Como puede observarse, al disminuir el potencial, la constante de equilibrio (K_{sup}) se hace menor, lo cual significa que la energía libre de la reacción de coordinación (ΔG°) aumenta al disminuir el potencial. Al disminuir el potencial aplicado, el electrodo se carga negativamente, haciendo más negativo al campo eléctrico. Esta tendencia es consistente

con lo observado en el capítulo anterior para energía de disociación de la porfirina modelo *PorIm* en el cual el cambio en el momento dipolar de la reacción debería ser similar. Sin embargo, la incertidumbre de la medida aumenta considerablemente al disminuir el potencial del electrodo, esto se debe probablemente a que la superficie y las porfirinas tienden a reorganizarse a potenciales extremos. Esto también puede observarse en la dispersión del parámetro n . Con éste parámetro y la ecuación III.2.18 se calculó la dispersión de los estados de energía de coordinación del sistema (σ) arrojando valores cercanos a 1 kcal.mol^{-1} . En el próximo capítulo se estimarán los valores del campo eléctrico y se realizarán cálculos específicos sobre este sistema en particular evaluando si la magnitud de estos pequeños corrimientos son consistentes con el cambio en la intensidad del campo eléctrico presente en los electrodos a los potenciales de trabajo utilizados.

III.2.3.3. Medición de la constante de equilibrio en solución

Se determinó el valor de la constante de equilibrio de coordinación de *1MIm* a *acZnMes* en solución con el fin de compararla con la que se midió en superficie. Dado que la porfirina no es soluble en agua, la medición se realizó en cloroformo.

Para la reacción de coordinación en equilibrio con su disociación (ecuación III.2.24)



se planteó la siguiente constante de equilibrio en solución:

$$K_{sn} = \frac{[1MIm - acZnMes]}{[1MIm][acZnMes]} \quad (\text{III.2.25})$$

Dadas las concentraciones iniciales $[1MIm]_0$ y $[acZnMes]_0$, y la ecuación III.2.25, se puede plantear exactamente la concentración de cada una de las especies en equilibrio en función de la constante de equilibrio y las concentraciones iniciales mencionadas de la siguiente manera siendo $I = 1MIm$, $Z = acZnMes$ y $IZ = 1MIm - acZnMes$:

$$[IZ] = \frac{1}{2} \left([Z]_0 + [I]_0 + \frac{1}{K} \right) - \frac{1}{2} \sqrt{\left([Z]_0 + [I]_0 + \frac{1}{K} \right)^2 - 4[Z]_0[I]_0} \quad (\text{III.2.26})$$

$$[Z] = [Z]_0 - [IZ] \quad (\text{III.2.27})$$

$$[I] = [I]_0 - [IZ] \quad (\text{III.2.28})$$

Se tomaron distintos espectros UV-Visible de las soluciones entre 380 y 650 nm (donde

no aparecen bandas del $1MIm$) para cada concentración de $1MIm$ (Figura III.2.11). Se construyó la matriz de datos A que contiene en los elementos de cada columna los valores de absorbancia de cada espectro tomado. Cada espectro se corresponde con una dada concentración de $1MIm$ inicial que va desde 0 a 0.05 M . Cada elemento de la fila corresponde al valor de absorbancia de cada longitud de onda. Se tuvieron en cuenta las diluciones producidas por el agregado de las alícuotas de las soluciones de $1MIm$.

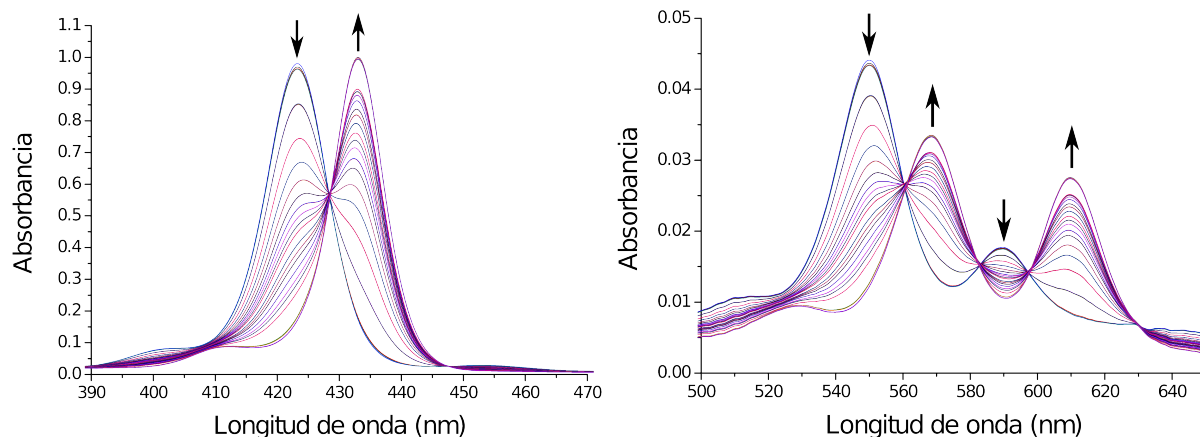


Figura III.2.11: Espectros UV-Visible tomados a cada alícuota de $1MIm$ agregada. Izquierda: espectros de la zona de la banda de Soret de las porfirinas. Derecha: espectros de la zona de las bandas Q de las porfirinas.

Como se explica en los métodos generales se realizó una descomposición de la matriz de datos en sus valores singulares. Se pudo determinar que los espectros medidos sólo tienen dos componentes principales que están relacionados con los espectros de $acZnMes$ y de $1MIm - acZnMes$. Se reconstruyó la matriz de datos a partir de las dos primeras columnas de las matrices *hanger* (U_c) y *aligner* (V_c) y de los dos primeros elementos diagonales del *stretcher* (Σ_c). La matriz de datos reconstruida sin los componentes secundarios (A') coincidió con elevada exactitud con la matriz de datos original, confirmando que los espectros tomados son combinación lineal de estos dos componentes principales. Se construyó la matriz rotacional R de forma tal de transformar U_c , V_c y Σ_c (como se explica en los métodos) en una matriz formada por la absorptividad molar a cada longitud de onda de cada especie ($acZnMes$ y $1MIm - acZnMes$) (E) y otra matriz con las concentraciones de cada una de estas especies para cada concentración inicial de $1MetIm$ dada (C) (ecuaciones III.2.29, III.2.30 y III.2.31).

$$A' = EC \quad (III.2.29)$$

$$E = U_c \Sigma_c R \quad (III.2.30)$$

$$C = R^{-1}V_c^T \quad (\text{III.2.31})$$

Dado que sólo se consideraron 2 componentes principales la dimensión de R es de 2×2 . Se obtuvo una primera aproximación de la matriz R construyendo una matriz E utilizando como vectores columna la absorptividad molar (ϵ) para cada λ de $acZnMes$ y $1MIm - acZnMes$ (ecuación III.2.32).

$$R = \Sigma_c^{-1}U_c^T E \quad (\text{III.2.32})$$

Se utilizó para estimar el vector ϵ_λ de $1MIm - acZnMes$ el último espectro tomado a la mayor concentración inicial de $1MIm$ utilizada. Como el equilibrio a esta concentración de $1MIm$ no está completamente desplazado hacia el lado de $1MIm - acZnMes$ se procedió a ajustar los dos elementos del segundo vector columna de R (que sólo depende de ϵ_λ de $1MIm - acZnMes$) de forma tal de satisfacer la condición de que la sumatoria de los vectores filas de C se correspondan con la concentración total de porfirinas $[Z]_0$ (ecuación III.2.27) dado que los elementos de la primer y segunda fila de C contienen a $[Z]$ y $[IZ]$, respectivamente. De esa forma se obtiene R con la cual se calcula E cuyos vectores columna (ϵ_λ , Absorptividad molar) se grafican en la Figura III.2.12.

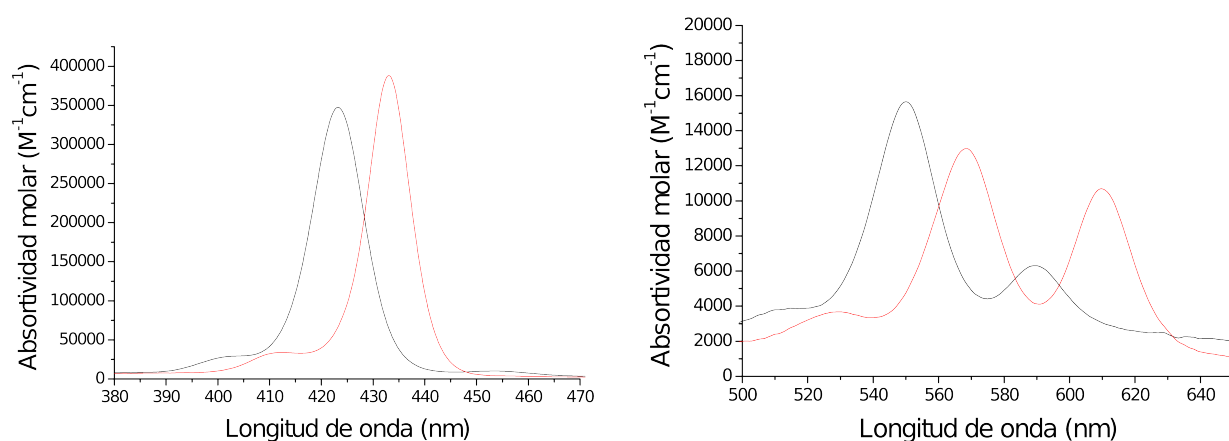


Figura III.2.12: Vectores columna de la matriz E . Absorptividad molar (ϵ_λ) de $acZnMes$ (en negro) y $1MIm - acZnMes$ (rojo). Izquierda: espectro de la zona de la banda de Soret. Derecha: espectro de la zona de las bandas Q.

Los vectores fila de la matriz C (concentración molar) se grafican en la Figura III.2.13. Las ecuaciones III.2.26 y III.2.27 se ajustaron a los datos obteniéndose la constante de equilibrio de coordinación de $1MIm$ a $acZnMes$ (8723 ± 38) siendo ésta muy similar a las constantes de equilibrio de coordinación de imidazol a otras tetrafenilporfirinas [11].

La constante de equilibrio obtenida en solución (K_{sn}) difiere en casi dos ordenes de magnitud de las obtenidas en superficie (K_{sup}). Estas diferencias serían posiblemente atribuibles a:

1. Los distintos solventes utilizados en cada experimento: agua vs cloroformo. La contribución de la energía libre de solvatación a la energía libre del proceso es distinta en ambas situaciones.
2. El cambio de entropía de la reacción producida en solución y en superficie es considerablemente diferente.
3. Al no ser el mismo campo eléctrico, la energía de coordinación difiere.
4. La reacción que ocurre en superficie no es la misma que en solución.

En el próximo capítulo se estimará el valor del campo eléctrico obtenido para cada potencial y se realizarán cálculos computacionales que ayudarán a completar este análisis.

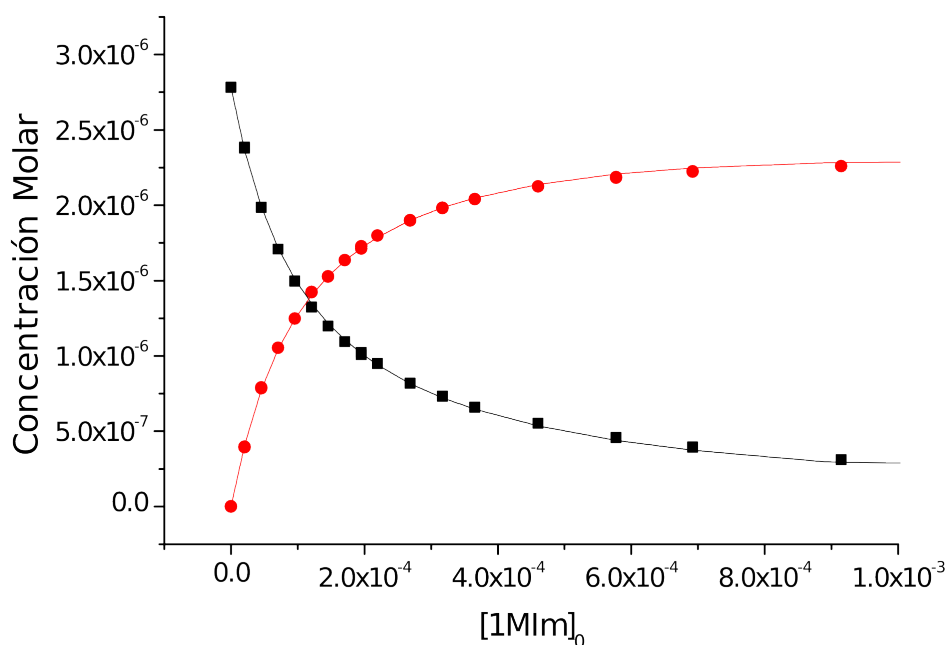


Figura III.2.13: Vectores fila de la matriz C . Concentración molar de $acZnMes$ (en negro) y $1MIm - acZnMes$ (en rojo) para cada concentración molar inicial de $1MIm$ ($[1MIm]_0$) obtenidos del análisis de SVD (círculos y cuadrados). Las curvas corresponden al ajuste utilizando las ecuaciones III.2.26 y III.2.27.

III.2.4. Conclusiones

En este capítulo se evaluó la hipótesis de si el campo eléctrico era capaz de producir un corrimiento en una constante de equilibrio. Esto se llevó a cabo a través de la inmovilización de porfirinas con 4 tioles en sus cadenas laterales sobre electrodos de oro y plata. La caracterización realizada a través de métodos electroquímicos, STM y XPS indicaron que la porfirina se adsorbe de manera coplanar a la superficie del electrodo con un recubrimiento de $5 \cdot 10^{-12} \text{ mol.cm}^{-2}$. Con la técnica SERRS fue posible detectar estas bajas concentraciones de porfirina y estimar valores de la constante de equilibrio de coordinación del imidazol disuelto en agua a las porfirinas adsorbidas durante la aplicación de distintos potenciales. Las constantes de equilibrio determinadas a través de esta técnica tendieron a ser menores con la disminución de los potenciales aplicados, o sea, a campos eléctricos más negativos. Esta tendencia es consistente con lo que se observó en los sistemas modelo del capítulo anterior. Posteriormente, utilizando espectroscopía UV-Visible, se determinó la constante de equilibrio de este sistema en solución. Esto se llevó a cabo con fines comparativos dado que, en estas condiciones, el campo eléctrico externo es nulo. Se utilizó como solvente en este caso cloroformo debido a que la porfirina no es soluble en solventes polares como el agua. El valor de la constante medida fue dos órdenes mayor que las obtenidas en superficie. Fueron propuestas cuatro posibles explicaciones para comprender estas diferencias: 1) las reacciones fueron llevadas a cabo en solventes de polaridades muy distintas; 2) el cambio de entropía en la reacción producida en superficie y en solución difieren considerablemente contribuyendo a las diferencias en las constantes de equilibrio; 3) las diferencias residen en los campos eléctricos presentes en las reacciones en ambas circunstancias; y 4) las reacciones que ocurren en agua y en cloroformo no son las mismas por lo tanto las constantes de equilibrio no son comparables.

En el próximo capítulo se determinarán las magnitudes de los campos eléctricos presentes en la reacción en superficie y se efectuarán cálculos de estructura electrónica sobre este sistema en particular. Con los resultados que se obtengan se intentará completar el análisis de los resultados observados en el presente capítulo.

III.2.5. Bibliografía

- [1] C. D. Zangmeister, L. B. Picraux, R. D. van Zee, Y. X. Yao, y J. M. Tour. Energy-level alignment and work function shifts for thiol-bound monolayers of conjugated molecules self-assembled on Ag, Cu, Au, and Pt. *Chemical Physics Letters*, 442:390–393, 2007.
- [2] M. Wirde, U. Gelius, y L. Nyholm. Self-assembled monolayers of cystamine and cysteamine on gold studied by XPS and voltammetry. *Langmuir*, 15:6370–6378, 1999.
- [3] T. Lotzbeyer, W. Schuhmann, E. Katz, J. Falter, y H. L. Schmidt. Direct electron-transfer between the covalently immobilized enzyme microperoxidase MP-11 and a cystamine-modified gold electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 377:291–294, 1994.
- [4] H. M. Goldston, A. N. Scribner, S. A. Trammell, y L. M. Tender. A model recognition switch. electrochemical control and transduction of imidazole binding by electrode-immobilized microperoxidase-11. *Chemical Communications*, pages 416–417, 2002.
- [5] N. Nishimura, M. Ooi, K. Shimazu, H. Fujii, y K. Uosaki. Post-assembly insertion of metal ions into thiol-derivatized porphyrin monolayers on gold. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 473:75–84, 1999.
- [6] J. Awruch, A. Lemberg, R. B. Frydman, y B. Frydman. Degradation of Hemin IX and synthetic hemins to alpha-bilirubins and their conjugates in the isolated perfused-rat-liver. *Biochimica et Biophysica Acta*, 714:209–216, 1982.
- [7] J. Zak, H. P. Yuan, M. Ho, L. K. Woo, y M. D. Porter. Thiol-derivatized metalloporphyrins - monomolecular films for the electrocatalytic reduction of dioxygen at gold electrodes. *Langmuir*, 9:2772–2774, 1993.
- [8] J. E. Hutchison, T. A. Postlethwaite, y R. W. Murray. Molecular films of thiol-derivatized tetraphenylporphyrins on gold - film formation and electrocatalytic dioxygen reduction. *Langmuir*, 9:3277–3283, 1993.
- [9] T. Akiyama, H. Imahori, y Y. Sakata. Preparation of molecular assemblies of porphyrin-linked alkanethiol on gold surface and their redox properties. *Chemistry Letters*, pages 1447–1450, 1994.
- [10] K. Shimazu, M. Takechi, H. Fujii, M. Suzuki, H. Saiki, T. Yoshimura, y K. Uosaki. Formation and characterization of thiol-derivatized zinc(ii) porphyrin monolayers on gold. *Thin Solid Films*, 273:250–253, 1996.

-
- [11] K. M. Kadish, K. M. Smith, y R. Guilard, editors. *The Porphyrin Handbook*, volumen 9. Academic Press, 2000.
- [12] T. M. Cotton, S. G. Schultz, y R. P. Vanduyne. Surface-enhanced resonance raman-scattering from water-soluble porphyrins adsorbed on a silver electrode. *Journal of the American Chemical Society*, 104:6528–6532, 1982.
- [13] F. Terán Arce, M. E. Vela, R. C. Salvarezza, y A. J. Arvia. Dynamic characteristics of adsorbed monolayers of 1-dodecanethiol on gold (111) terraces from in-situ scanning tunneling microscopy imaging. *Electrochimica Acta*, 44:1053–1067, 1998.
- [14] O. P. H. Vaughan, M. Turner, F. J. Williams, A. Hille, J. K. M. Sanders, y R. M. Lambert. Direct observation of surface-mediated thioacetyl deprotection: Covalent tethering of a thiol-terminated porphyrin to the Ag(100) surface. *Journal of the American Chemical Society*, 128:9578–9579, 2006.
- [15] A. Kudelski y W. Hill. Raman Study on the Structure of Cystamine Monolayers on Silver. *Langmuir*, 15:3162–3168, 1999.
- [16] R. F. Pasternack, B. S. Gillies, y J. R. Stahlbush. Kinetics and Thermodynamics of the Reactions of Two Iron(III) Porphyrins with Imidazole and 1-Methylimidazole in Dimethyl Sulfoxide. *Journal of the American Chemical Society*, 100(9):2613–2619, 1978.
- [17] G. B. Kolski y R. A. Plane. Temperature-Jump Investigation of the Kinetics of Imidazole Substitution on an Iron(III) Porphyrin in Aqueous Solution. *Journal of the American Chemical Society*, 94(11):3740–3744, 1972.
- [18] M. M. Walczak, D. D. Popenoe, R. S. Deinhammer, B. D. Lamp, C. Chung, y M. D. Porter. Reductive Desorption of Alkanethiolate Monolayers at Gold: A Measure of Surface Coverage. *Langmuir*, 7:2687–2693, 1991.
- [19] O. P. H. Vaughan, F. J. Williams, N. Bampos, y R. M. Lambert. A Chemically Switchable Molecular Pinwheel. *Angewandte Chemie International Edition*, 45:3779–3781, 2006.
- [20] F. J. Williams, O. P. H. Vaughan, K. J. Knox, N. Bampos, y R. M. Lambert. First observation of capping/uncapping by a ligand of a Zn porphyrin adsorbed on Ag(100). *Chemical Communications*, pages 1688–1689, 2004.
- [21] Ricardo Aroca. *Surface enhanced vibrational spectroscopy*. Wiley, Chichester, 2006.

- [22] Richard L. McCreery. *Raman Spectroscopy for Chemical Analysis*. Wiley, 2000.
- [23] J. H. de Boer. *The Dynamical Character of Adsorption*. Clarendon Press, Oxford, 1953.
- [24] Duong D. Do. *Adsorption Analysis: Equilibria and Kinetics*. Imperial College Press, 1998.
- [25] J. J. Kipling. *Adsorption from Solutions of Non-Electrolytes*. Academic Press, London, 1965.
- [26] S. Ross y J. P. Olivier. *On Physical Adsorption*. Wiley, New York, 1964.
- [27] D. M. Young y A. D. Crowell. *Physical Adsorption of Gases*. Butterworths, London, 1962.

III.3

Estimación del campo eléctrico usando la teoría de la doble capa

III.3.1. Introducción

En los capítulos anteriores se ha calculado como afecta el campo eléctrico a las reacciones de coordinación de ligandos y reacciones redox de porfirinas. Posteriormente, se estudió experimentalmente como afecta la aplicación de potenciales eléctricos a la reacción de coordinación de imidazol a porfirinas adsorbidas químicamente a electrodos. Queda por determinar cuáles son las magnitudes de los campos eléctricos que perciben las porfirinas a cada potencial de electrodo aplicado. Estos campos son fácilmente calculados para el caso de un capacitor eléctrico en el cual se aplica un potencial entre dos placas conductoras separadas por un material dieléctrico (no conductor), pero no es el caso cuando el material entre las placas es una solución conductora.

En este capítulo se estimará el campo eléctrico en este tipo de sistemas utilizando el modelo de la doble capa de Gouy-Chapman y Stern que brinda relaciones matemáticas de las que se obtiene el campo eléctrico a cada potencial de electrodo aplicado a lo largo de la distancia perpendicular al plano de la superficie del electrodo. Para determinar el campo utilizando estas relaciones es necesario conocer la capacidad del electrodo, el potencial de carga cero, el área del electrodo y el ancho de la monocapa. Finalmente se analizarán los resultados conjuntamente con los del capítulo anterior comparándolos con cálculos de estructura electrónica del sistema estudiado.

III.3.2. Teoría

La estimación del campo eléctrico que se describirá a continuación está basada en la teoría de la doble capa de Gouy-Chapman y Stern, la cual supone que la estructura eléctrica del sistema electrodo-solución¹ se compone de dos capas: la capa compacta y la capa difusa (Figura III.3.1). La primera se ubica entre el plano de la superficie del metal (plano 0) y el plano que se encuentra dentro de la solución de máximo acercamiento al electrodo de los iones (plano 2). Esta distancia de máximo acercamiento es producida por la presencia de compuestos no cargados eléctricamente que puedan estar adsorbidos química o físicamente sobre la superficie del metal y que limiten la aproximación de los iones. Estos compuestos pueden ser agua, moléculas orgánicas o tioles. Otro factor que limita el acercamiento de los iones es el agua de solvatación de los mismos. Existe la posibilidad de que iones se adsorban específicamente sobre la superficie del metal formando el plano 1 pero este caso no fue considerado. La capa difusa se compone por sucesivas capas de iones de libre movilidad que se encuentran en exceso respecto de la concentración analítica de la solución. A medida que se aleja del electrodo, la concentración de iones se va aproximando a la concentración analítica.

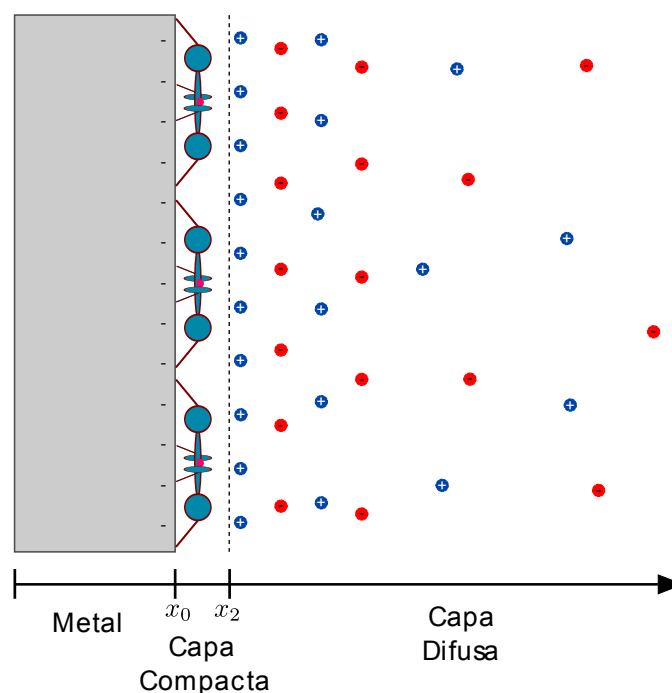


Figura III.3.1: Esquema del modelo de la doble capa de Gouy-Chapman y Stern.

Se define capacidad diferencial como la derivada de la carga eléctrica del metal (q) respecto al potencial aplicado (E) a potencial químico constante (μ) (ecuación III.3.1).

¹La solución a la que se refiere contiene iones.

$$C = \left(\frac{\partial q}{\partial E} \right)_\mu \quad (\text{III.3.1})$$

La capacidad diferencial del electrodo de trabajo (C) se relaciona con las capacidades de la capa compacta (C_c) y de la capa difusa (C_d) a la manera de capacitores conectados en serie:

$$\frac{1}{C} = \frac{1}{C_c} + \frac{1}{C_d} \quad (\text{III.3.2})$$

Dado que estos sistemas no se comportan como un capacitor ideal, la capacidad depende del potencial aplicado, por lo cual para determinar la carga del electrodo es necesario conocer la función de la capacidad respecto del potencial. Al integrar la ecuación III.3.1 se obtiene la carga del metal q al potencial E a partir de la función de capacidad total, como se muestra en la ecuación III.3.3.

$$q = \int_{E_z}^E C dE \quad (\text{III.3.3})$$

Al potencial del límite inferior de la integración se lo conoce como potencial de carga cero que como su nombre lo indica es el potencial al cual el metal no posee carga neta y es necesario conocerlo para determinar la carga del metal a otros potenciales.

A la capacidad de la capa compacta se la puede describir como un capacitor de caras paralelas con un dieléctrico entre ellas (ecuación III.3.4):

$$C_c = \frac{\epsilon_0 \epsilon_r^c A}{x_2} \quad (\text{III.3.4})$$

donde A es la superficie del metal, x_2 es el ancho de la capa compacta, ϵ_0 es la constante dieléctrica del vacío² y ϵ_r^c es la constante dieléctrica relativa de los componentes que forman la capa compacta. Tanto ϵ_r^c como x_2 son funciones de la carga del metal dado que la capa compacta puede expandirse/comprimirse y polarizarse no linealmente a valores de campos eléctricos altos por lo cual la capacidad de la capa compacta no es constante con el potencial.[1]

Queda por conocer de qué factores depende la capacidad de la capa difusa y cómo son estas relaciones. En la capa difusa, el campo eléctrico (F) definido como la derivada del potencial interno o de Galvani (ϕ)³ respecto a la coordenada x^4 se relaciona con ϕ , la con-

² $\epsilon_0 = 8.8541878176 \cdot 10^{-12} \frac{C^2}{Nm^2}$

³ ϕ es el potencial debido a las cargas y a los dipolos en la doble capa y no es el mismo que potencial aplicado E . Ver referencia 1, página 11.

⁴El eje x es perpendicular al plano de la superficie del electrodo. $x = 0$ en la interfaz metal-solución y $x > 0$ dentro de la solución.

centración analítica c^s del electrolito i y la constante dieléctrica relativa de la solución $(\epsilon_r^s)^5$ como indica la ecuación III.3.5 [1]:

$$F^2 = \left(\frac{\partial \phi}{\partial x} \right)^2 = \frac{2RT}{\epsilon_0 \epsilon_r^s} \sum c_i^s \left(e^{\frac{-z_i \mathcal{F} \phi}{RT}} - 1 \right) \quad (\text{III.3.5})$$

donde R es la constante de los gases⁶, T la temperatura absoluta⁷, z es la carga del electrolito i (con signo), y \mathcal{F} es la constante de Faraday⁸.

La carga del electrodo por unidad de área ($\bar{q} = \frac{q}{A}$) se relaciona con F por el teorema de Gauss que dice:

$$-F_2 = \left(\frac{\partial \phi}{\partial x} \right)_{x_2} = -\frac{\bar{q}}{\epsilon_0 \epsilon_r} \quad (\text{III.3.6})$$

Al comportarse la capa compacta como un capacitor, el campo eléctrico dentro de ella será constante por lo cual vale que:

$$-F_2 = -F_c = \frac{\phi_2 - \phi_m}{x_2} \quad (\text{III.3.7})$$

donde el subíndice m se refiere al metal donde $x_0 = 0$ y c se refiere en al interior de la capa compacta entre x_0 y x_2 . Por la misma razón también vale:

$$C_c = \frac{q}{\phi_m - \phi_2} \quad (\text{III.3.8})$$

El objetivo principal de esta sección es determinar el campo eléctrico en la capa compacta que se puede estimar combinando las ecuaciones III.3.7 y III.3.8 para llegar a:

$$F_c = \frac{q}{C_c x_2} \quad (\text{III.3.9})$$

Bajo estas circunstancias hay que suponer que x_2 es relativamente constante, una aproximación generalmente acertada. El valor de q se obtiene a partir de la ecuación III.3.3. Habiendo medido la capacidad del electrodo, resta conocer la capacidad de la capa difusa para obtener empleando la ecuación III.3.2 la capacidad de la capa compacta y así obtener el valor de campo mediante la ecuación III.3.9.

Combinando la ecuación III.3.5 y III.3.6 para una sal que se disocia en dos iones de cargas iguales y opuestas $|z|$ se obtiene el potencial en 2 (ϕ_2):

⁵Para el caso de la capa difusa, ϵ_r^s es la constante dieléctrica relativa de la solución que para el caso del agua a 25°C es 78.49. Ver referencia 2 página 472.

⁶ $R = 8.31447215 \frac{J}{K \cdot mol}$

⁷Siempre se utilizó $T = 298.15 K$

⁸ $F = 96485.339924 \frac{C}{mol}$

$$\phi_2 = \frac{2RT}{|z|\mathcal{F}} \operatorname{arcsenh} \left(\frac{\bar{q}}{2\sqrt{2RT\epsilon_0\epsilon_r^s c^s}} \right) \quad (\text{III.3.10})$$

Tomando III.3.10, poniendo \bar{q} en función de ϕ_2 y derivando \bar{q} en función de ϕ_2 se obtiene la capacidad de la capa difusa que se expresa en la ecuación III.3.11 en función de \bar{q} .

$$C_d = \frac{|z|\mathcal{F}A}{2RT} \sqrt{\bar{q}^2 + 8RT\epsilon_0\epsilon_r^s c^s} \quad (\text{III.3.11})$$

Se quiere conocer como varía el campo eléctrico a lo largo del eje x . Dentro de la capa compacta, el campo es constante entre x_0 y x_2 , por lo cual, el potencial variará linealmente con la distancia (ecuación III.3.12 obtenida a partir de III.3.7).

$$\phi = \phi_2 + F_c(x_2 - x), \quad 0 \leq x \leq x_2 \quad (\text{III.3.12})$$

En la capa difusa la situación es distinta. Si se conociera $\phi(x)$ de la capa difusa con la ecuación III.3.5 se podría obtener como varía F con x . En el caso de una sal que se disocia en dos iones de igual valor absoluto de carga vale la ecuación III.3.13.

$$F = -\frac{\partial\phi}{\partial x} = \sqrt{\frac{8RTc^s}{\epsilon_0\epsilon_r^s}} \operatorname{senh} \left(\frac{|z|\mathcal{F}}{2RT} \phi \right) \quad (\text{III.3.13})$$

Para ello, partiendo de III.3.13 y resolviendo la ecuación diferencial se obtiene (Referencia 2, página 479):

$$\phi = \frac{4RT}{|z|\mathcal{F}} \operatorname{arctanh} \left(e^{-\kappa(x-x_2)} \tanh \left(\frac{|z|\mathcal{F}}{4RT} \phi_2 \right) \right), \quad \kappa = |z|\mathcal{F} \sqrt{\frac{2c^s}{RT\epsilon_0\epsilon_r^s}}, \quad x \geq x_2 \quad (\text{III.3.14})$$

con la cual se podrá realizar esta estimación.

En el análisis efectuado hasta el momento no se mencionó cómo determinar el potencial de carga cero (pc_0). El pc_0 es un parámetro dependiente de la naturaleza del metal y de la solución por lo cual es difícil encontrar un pc_0 tabulado para la solución, y para el tipo y cara del metal utilizado en cada experimento, y es necesario conocerlo ya que puede ser muy sensible a estos factores. Existen varios principios físicos utilizados en los métodos disponibles para la determinación de este valor. El método escogido en este trabajo de tesis es el *método de la expansión de la superficie*. Este método se destaca por su fácil aplicabilidad, por ser directo y porque permite obtener valores de pc_0 a concentraciones fijas de electrolito lo cual es una ventaja ya que a veces el pc_0 es dependiente de la concentración. Este método consiste en aplicar un potencial a medida que se varía el área del electrodo midiendo simultáneamente

la corriente i que según la relación de la ecuación III.3.15 indica que cuando se varía el área en el potencial de carga cero la corriente que se mide es también cero. [3]

$$i = \bar{q}(E) \frac{\partial A}{\partial t} \quad (\text{III.3.15})$$

Cuando una sustancia se adsorbe al metal y produce que éste se cargue positivamente se observa un corrimiento del potencial de carga cero hacia potenciales negativos y pasa lo opuesto cuando hace que se cargue negativamente (Figura III.3.2). Generalmente, cuando un adsorbato de composición orgánica se adsorbe sobre la superficie un metal, se desplaza el agua adsorbida corriendo el potencial de carga cero hacia valores menores. A este proceso se lo conoce en inglés como *squeezing-out* [4, 3]. Si el compuesto orgánico no le cambia la densidad de carga al metal, este fenómeno puede explicarse suponiendo que el agua tiende a volver más negativo al metal lo cual hace que el pc0 se desplace hacia el positivo y entonces al removerla el pc0 se corre hacia el negativo.

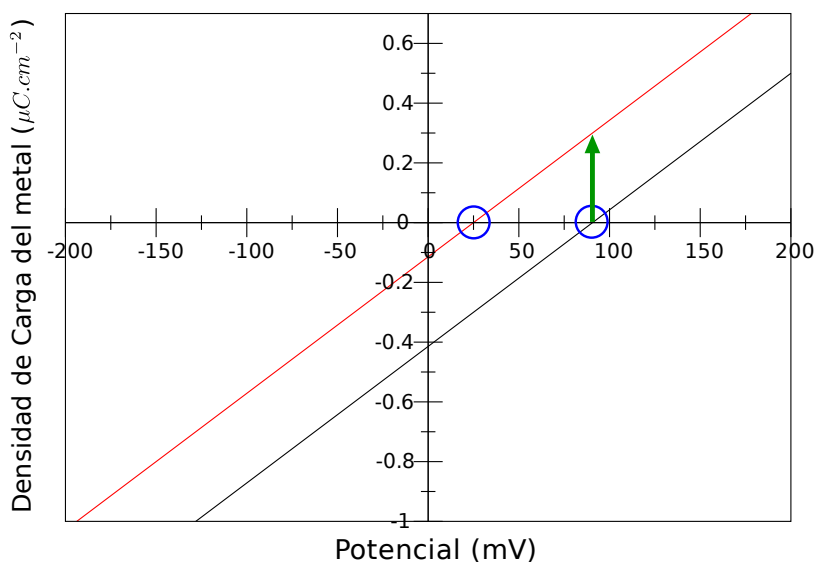


Figura III.3.2: Corrimiento del potencial de carga cero cuando un adsorbato vuelve más positivo al metal. La flecha verde indica el desplazamiento de la densidad de carga superficial del metal. Los círculos azules señalan los potenciales de carga cero de cada curva de carga vs. potencial.

III.3.3. Métodos

III.3.3.1. Descripción general

Los experimentos de determinación de la capacidad y el potencial de carga cero se llevaron a cabo en una solución de bórax ($Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$) $0.05\ M$ ($0.2\ M$ de borato) a $pH\ 9.2$ y $25^\circ C$. Se trabajó siempre con soluciones purgadas por más de 20 minutos con N_2 o Ar y aplicando un flujo del gas inerte en el espacio gaseoso de la celda para evitar el reingreso de O_2 .

La celda electroquímica que se utilizó se compone de un electrodo de trabajo de plata, un contraelectrodo de platino y un electrodo de referencia de $Ag/AgCl$ saturado. Para que en el circuito completo se esté midiendo la capacidad del electrodo de trabajo es necesario que la capacidad del contraelectrodo sea mucho mayor que la del de trabajo. Para eso se utilizó un alambre de platino enrollado que supera en más de 20 veces la superficie del electrodo de trabajo.

El electrodo de trabajo consistió en un alambre cilíndrico de plata de alta pureza de $1.0\ mm$ diámetro y $1.5\ cm$ de largo con un área geométrica de $0.479\ cm^2$. Se delimitó el largo del alambre con un cono de teflón agujereado como se muestra en la Figura III.3.3.

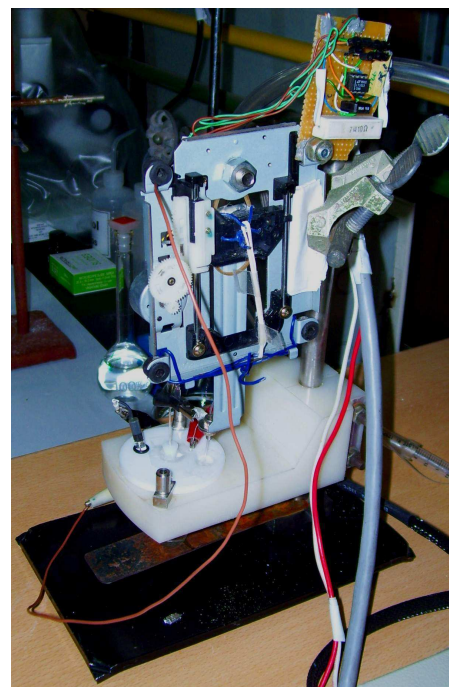
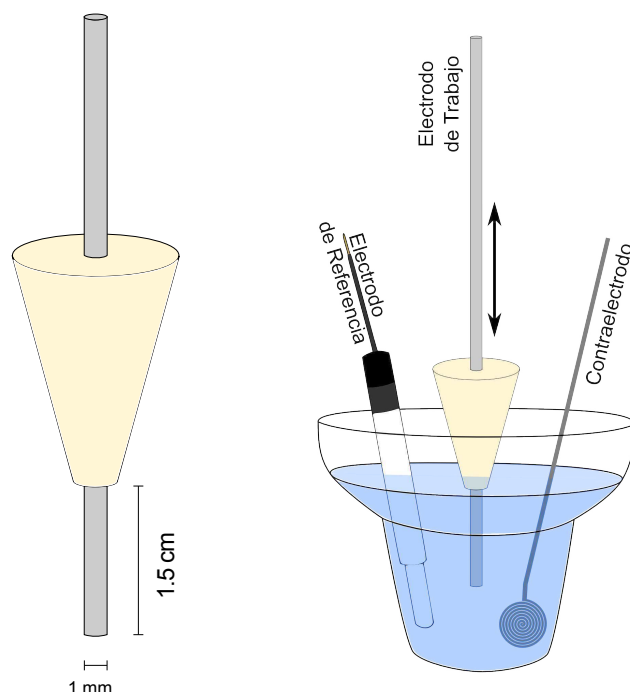


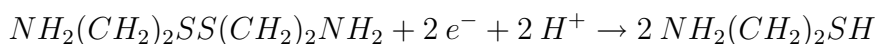
Figura III.3.3: Electrodo de trabajo (izquierda), esquema de la celda electroquímica (medio) y el dispositivo inmersor del electrodo (derecha).

Los electrodos se pulieron con alúmina de distintos tamaño de grano en forma decreciente

(1.0, 0.3 y 0.05 μm) depositados en una fibra sintética humedecida [5]. Se enjuagaron en una secuencia de agua-etanol-agua, se limpiaron con una fibra limpia embebida en agua-etanol y se enjuagaron nuevamente con la misma secuencia. Posteriormente, se sumergieron en una solución de 0.1 M de KOH aplicando un potencial de -2.0 V durante 1 minuto con un posterior enjuague para desorber todos los aniones que pudieran estar específicamente adsorbidos como así también eliminar alguna posible contaminación por tioles.

Los electrodos rugosos se prepararon a partir de los lisos sumergiéndolos en una solución de 0.1 M de KCl y 0.1 M de $LiClO_4$ y aplicando la secuencia de potencial: $-2\text{ V} \times 40\text{ seg}$ / $0.5\text{ V} \times 40\text{ seg}$ / $-0.5\text{ V} \times 40\text{ seg}$ / $0.5\text{ V} \times 15\text{ seg}$ / $-0.5\text{ V} \times 15\text{ seg}$ / $0.5\text{ V} \times 15\text{ seg}$ / $-0.5\text{ V} \times 30\text{ seg}$ / $-0.4 \times 300\text{ seg}$. Con la aplicación de dicha frecuencia, se obtuvieron electrodos con menor cantidad de $AgCl$ depositado en los electrodos que en los protocolos convencionales sin $LiClO_4$ [6]. Finalmente, los electrodos se sumergieron en la solución 0.1 M de KOH aplicando un potencial de -2.0 V por 1 minuto para desorber aniones y tioles.

Los electrodos con cistamina adsorbida se prepararon sumergiendo un electrodo limpio en una solución 50 mM de cistamina y 0.1 M de KOH en agua por más de 12 hs. La cistamina es un disulfuro que al reducirse se transforma en dos moléculas de cisteamina.



Cistamina

Cisteamina

La cistamina reacciona con el electrodo uniendo covalentemente cada azufre a la plata dando dos moléculas de cisteamina unidas a Ag .

Los electrodos con $ZnMes$ covalentemente inmovilizada se prepararon sumergiendo un electrodo limpio en una solución 10 μM de $ZnMes$ en una solución de cloroformo-etanol 9:1 por más de 24 hs.

Antes de cada experiencia se testeó con una voltametría cíclica de la solución correspondiente la limpieza de cada electrodo presentando cada uno de ellos un voltograma totalmente capacitivo libre de picos rédox en el rango de -600 y 200 mV .

III.3.3.2. Determinación del área promedio del electrodo

El área del electrodo se estimó a través de la desorción electroquímica de 10 electrodos lisos con cisteamina en una solución de KOH 0.1 M con 3 ciclos de barrido de potencial lineal desde -200 a -1400 mV a $100\text{ mV}.\text{seg}^{-1}$.

III.3.3.3. Determinación del potencial de carga cero

Se determinó el potencial de carga cero utilizando el principio que se resume en la ecuación III.3.15 para electrodos lisos, rugosos con y sin *ZnMes*. Se midieron 4 electrodos de cada tipo repitiendo el procedimiento 3 veces por cada uno. Para ello se aplicaron distintos potenciales constantes a cada electrodo de trabajo durante 90 segundos a medida que se sumergía y emergía el electrodo a una frecuencia de 1 ciclo cada 300 *mseg*. La corriente medida durante los últimos 60 segundos fue integrada en función del tiempo y dividida por la cantidad de ciclos, obteniendo un valor de carga total para cada ciclo. De los gráficos de carga en función del potencial se extrapolaron los valores del potencial de carga cero. Se creó un programa para automatizar este análisis de datos en particular. El dispositivo diseñado para sumergir el electrodo fue armado a partir de un motor de giro continuo y un sistema de ejes y engranajes que permiten transformar el movimiento rotatorio del motor en un movimiento lineal (ver Figura III.3.3). Dos bandas elásticas fueron insertadas para amortiguar el movimiento de bajada y subida del apéndice que sostiene al electrodo de trabajo. El motor era controlado por un circuito electrónico especialmente diseñado (ver Figura V.6.1 del Apéndice) que permitió el interfaseado a través del puerto paralelo con una computadora con la que se comandó su movimiento a partir de un *software* creado para tal fin.

III.3.3.4. Determinación de la capacidad

Para la determinación de la capacidad se utilizaron electrodos lisos y no rugosos debido a que estos últimos presentan una superficie de rugosidad variable entre cada uno de ellos y su superficie es inestable durante las experiencias con lo cual se pierde control del área del electrodo. Se determinó la capacidad de dos electrodos totalmente libres de material depositado y dos electrodos modificados con *ZnMes*, observando una buena reproducibilidad de los datos.

La capacidad se determinó utilizando un dispositivo *Lock-in* con el que se aplicó un potencial sinusoidal de frecuencia angular de $\omega = 2\pi 80 \text{ Hz}$ y amplitud de $V_{in} = 5 \text{ mV}$ montado sobre el potencial aplicado (E). El dispositivo mide la corriente del circuito y calcula el ángulo de desfase de la corriente respecto del potencial alterno aplicado (φ) y la corriente máxima I_{max} devolviendo los componentes de la corriente S y Q . [5]

$$S = I_{max}\cos(\varphi), \quad Q = I_{max}\sin(\varphi) \quad (\text{III.3.16})$$

Si el electrodo se comporta como un circuito RC, con los valores de F y Q se determinan los valores de R y C con las relaciones:

$$C = \frac{S^2 + Q^2}{\omega V_{in} Q}, R = \frac{V_{in} S}{S^2 + Q^2} \quad (\text{III.3.17})$$

El potencial E se aplicó realizando 5 ciclos de barrido de potencial desde -550 mV a 175 mV , retornando a -550 mV en forma de escalera con un escalón de 10 mV y velocidad de barrido de $50 \text{ mV} \cdot \text{seg}^{-1}$. Tanto el potencial E como S y Q fueron monitoreados por canales independientes a través de una placa de adquisición de datos analógico-digital conectada a una computadora que contenía un software específicamente programado para esta finalidad en particular.

III.3.3.5. Cálculos computacionales

Los cálculos se realizaron utilizando metodologías basadas en la teoría del funcional de la densidad. Se utilizó el funcional de intercambio y correlación híbrido de tres parámetros de Becke con el funcional de correlación de Lee, Yang y Parr (B3LYP) [7, 8, 9]. Todos los cálculos se hicieron con el paquete de programas de Gaussian 03 [10]. Se utilizó la función de base SDD (II.2.7). La carga y la multiplicidad de espín de todas las especies calculadas respectivamente fue de 0 y 1. La multiplicidad de espín de los estados fundamentales de las porfirinas con metal se verificaron calculando los primeros 3 estados de multiplicidad y luego escogiendo el más estable energéticamente. Se rotó a la porfirina de forma de que el eje- z se encuentre de forma paralela al vector perpendicular del anillo de las porfirinas (Figura III.3.4, derecha). Se optimizaron la geometrías de Zn(II)-meso-tetra(p-3-tiopropoxifenil) porfina (*ZnMes*, porfirina desacetilada), 1-metilimidazol (*1MIm*), y *1MIm* coordinado a *ZnMes* (*1MIm-ZnMes*) (Figura III.3.4) utilizando un alto criterio de convergencia (*tight*) en presencia y ausencia de un campo eléctrico de $0.1 \text{ V} \text{ \AA}^{-1}$ positivo y negativo aplicado sobre el eje- z (Figura III.3.4, derecha).

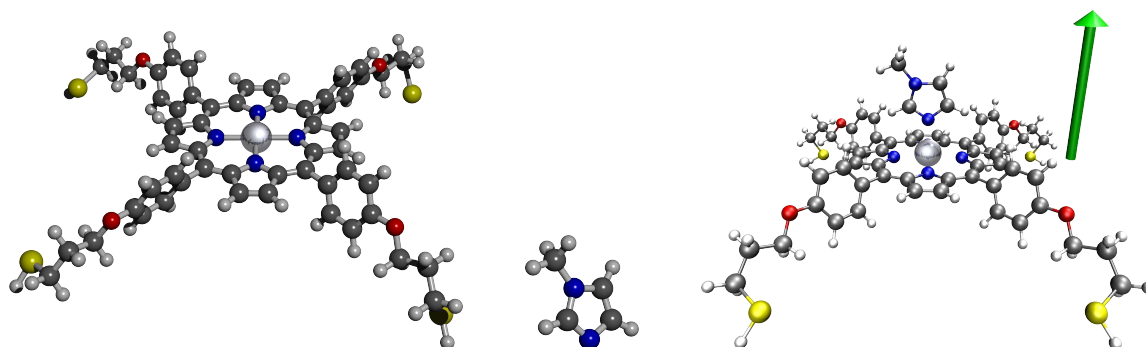


Figura III.3.4: Izquierda: *ZnMes*. Medio: 1-metilimidazol (*1MIm*). Derecha: *1MIm-ZnMes*, en verde: eje- z .

Posterior a la optimización se realizó un análisis vibracional (ver métodos generales) de

donde se obtuvo la energía del punto cero, las correcciones térmicas a la energía, la entalpía y energía libre. El campo eléctrico también fue aplicado durante el análisis vibracional. Los cálculos se realizaron en vacío, en agua y en cloroformo. Los cálculos de energía libre en estos solventes se obtuvieron a partir de cálculos de estructura electrónica utilizando el método PCM (sección II.2.6) sobre cada molécula cuya geometría fue optimizada en vacío.

III.3.4. Resultados y Discusión

III.3.4.1. Determinación del área del electrodo

De la función de intensidad de corriente (obtenida por voltametría cíclica) respecto al tiempo se calculó el área entre la onda de desorción y una línea recta entre los mínimos de la onda, que corresponde al pasaje de carga durante la desorción (Figura III.3.5) [11]. Cada unidad de carga elemental corresponde a una molécula de cisteamina desorbida. El pico de desorción se obtuvo en promedio a -1160 mV . Se procedió de esta forma para los 10 electrodos lisos analizados obteniendo un valor medio de $8.0 \cdot 10^{-10}\text{ mol}$ de cisteamina desorbida. Utilizando un recubrimiento por unidad de área típico de $1.0 \cdot 10^{-9}\text{ mol.cm}^{-2}$ [12] se estimó que el área media de los electrodos lisos analizados fue de $0.8 \pm 0.2\text{ cm}^2$, lo que corresponde a un factor de rugosidad⁹ de 1.7, el cual es consistente con valores previos informados [13]. Para los análisis posteriores esta fue la superficie de los electrodos lisos que se consideró.

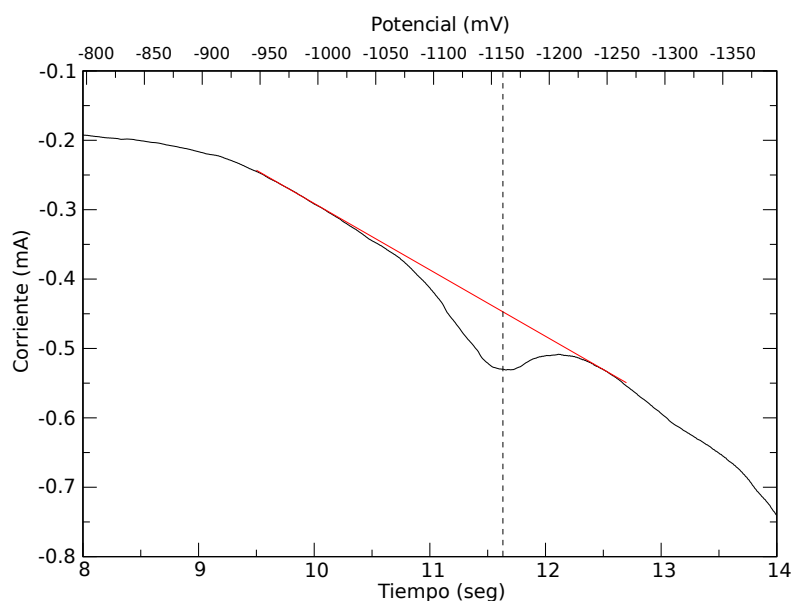


Figura III.3.5: Desorción de cisteamina en electrodo liso de Ag en 0.1 M KOH .

⁹Factor de rugosidad: es la relación entre el área efectiva y el área geométrica del electrodo.

III.3.4.2. Determinación del potencial de carga cero

La aplicación de distintos potenciales durante el procedimiento de sumergir reiteradas veces el electrodo producen picos de carga y descarga del electrodo. Al cruzar el potencial de carga cero estos picos se invierten como se muestra en la Figura III.3.6, donde los picos a -200 mV son negativos y a 200 mV son positivos.

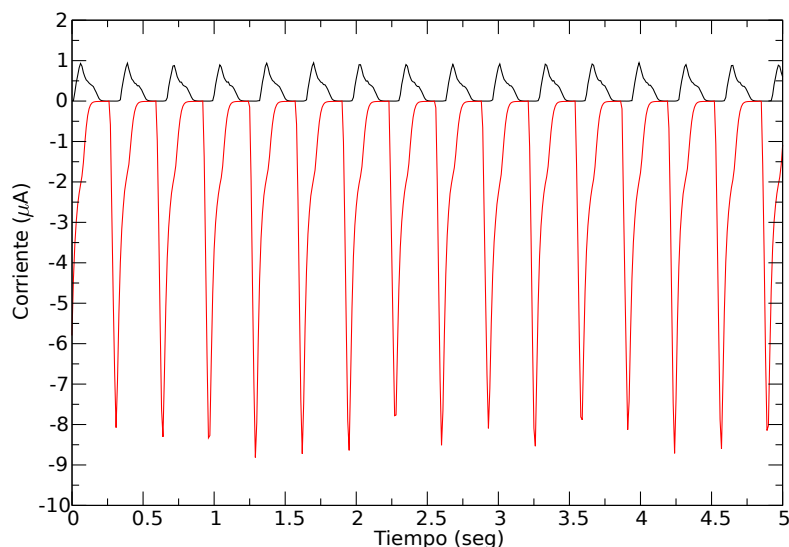


Figura III.3.6: Corriente en función del tiempo para sucesivas inmersiones de un electrodo liso modificado con *ZnMes*. Se aplicó en rojo -200 mV y en negro 200 mV .

De la carga promedio de cada pico en función del potencial se obtuvo, al extrapolar el potencial cuando la carga es 0, el valor de pc_0 buscado (Figura III.3.7). En la Tabla III.3.1 se muestran los potenciales de carga cero con su desviación estándar para los electrodos lisos y rugosos con y sin *ZnMes* depositada (12 mediciones para cada uno). Los electrodos lisos tienen un mayor valor de pc_0 respecto a los rugosos lo que se podría explicar considerando que los electrodos rugosos tienen una proporción distinta de caras cristalinas de plata expuestas y la naturaleza de la adsorción del agua en cada una de estas caras es distinta tanto en la energía de adsorción como en el recubrimiento y la orientación produciendo estas diferencias observadas en los pc_0 . Los electrodos lisos presentan un mayor valor de pc_0 respecto de los modificados con *ZnMes*. Esto es esperable según se explicó en III.3.2. Sin embargo, para los electrodos rugosos se observa un efecto opuesto, el pc_0 aumenta cuando la porfirina está inmovilizada. Dado que los valores de pc_0 para los electrodos rugosos y lisos con *ZnMes* son muy cercanos entre sí, es posible que esta tendencia opuesta se deba a que el agua en los electrodos rugosos desplazan el pc_0 en un sentido opuesto al de las aguas en el electrodo liso y al ser removidas en ambos casos y reemplazadas por compuestos que perturben menos

la densidad de carga del metal convergen a un valor similar de pc_0 . La mayor desviación estándar de los electrodos rugosos indican que hay una mayor variabilidad en sus superficies dada por el procedimiento de preparación.

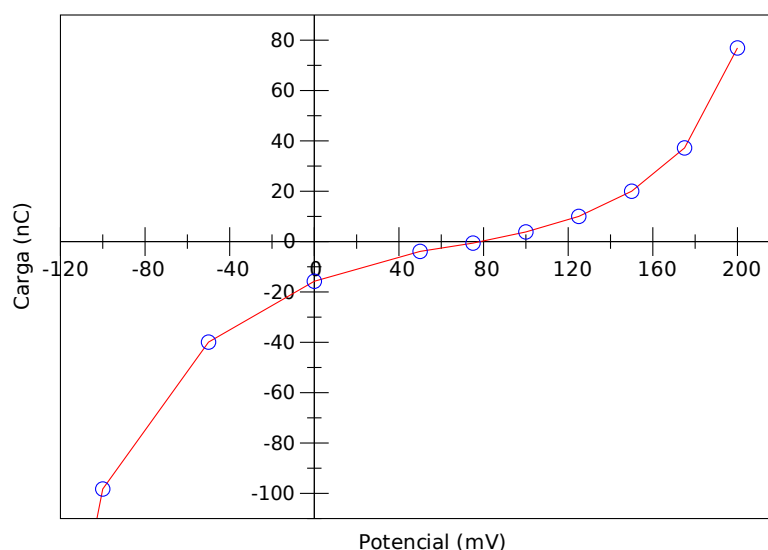


Figura III.3.7: Carga promedio en función del potencial de cada pico de carga y descarga de un electrodo liso modificado con *ZnMes*.

Tabla III.3.1: Potencial de Carga Cero (pc_0) respecto a $Ag/AgCl$ y su desviación estándar en mV de 12 mediciones de electrodos lisos y rugosos con y sin *ZnMes* adsorbida.

Tipo de Electrodo	pc_0 (mV)	Desviación Estándar (mV)
Liso	150.2	9.7
Rugoso	56.6	17.6
Liso con <i>ZnMes</i>	95.0	10.7
Rugoso con <i>ZnMes</i>	83.4	11.7

Otra cuestión que llama la atención es el valor de pc_0 . En muchos trabajos se informa que el valor de pc_0 de las distintas caras de la plata oscilan entre -0.7 y -1.0 V (vs. *Ag/AgCl*) [4, 14, 15]. Estos valores se obtienen a través de curvas de capacitancia diferencial vs. potencial en soluciones diluidas de *NaClO₄* o *NaF*. En estos casos, la contribución de la capacitancia de la capa difusa se hace más importante respecto a la total, entonces según la ecuación III.3.11 se puede observar que en el mínimo se ubica el potencial de carga cero. Sin embargo, según Delahay (referencia. 1, página 127), los potenciales de carga cero para metales sólidos no son tan confiables como para el mercurio debido a la incertidumbre en la interpretación de los resultados para algunos métodos de determinación, como por ejemplo

el que se menciona. Esta suposición de que el mínimo en las curvas de capacidad-potencial para soluciones diluidas ocurre en el punto de carga cero no parece ser siempre válida para metales sólidos aunque sí lo es para el mercurio. En las referencias 16 y 1 se informa un valor de potencial de carga cero de la plata de -149mV (vs Ag/AgCl) medido en 0.1M de KNO_3 con otra metodología. Este valor difiere considerablemente de los otros valores determinados con el método del mínimo de la capacidad y es más cercano a los valores informados en este trabajo en bórax 0.05M .

III.3.4.3. Determinación de la capacidad y estimación del campo eléctrico

Según lo descrito en III.3.3.4 se midió la capacidad diferencial de electrodos lisos en solución de bórax. Con el área medida en III.3.4.1 se obtuvo la capacidad por unidad de área en función del potencial aplicado para los 5 ciclos de barrido y se ajustó a un polinomio de grado 5 (Figura III.3.8).

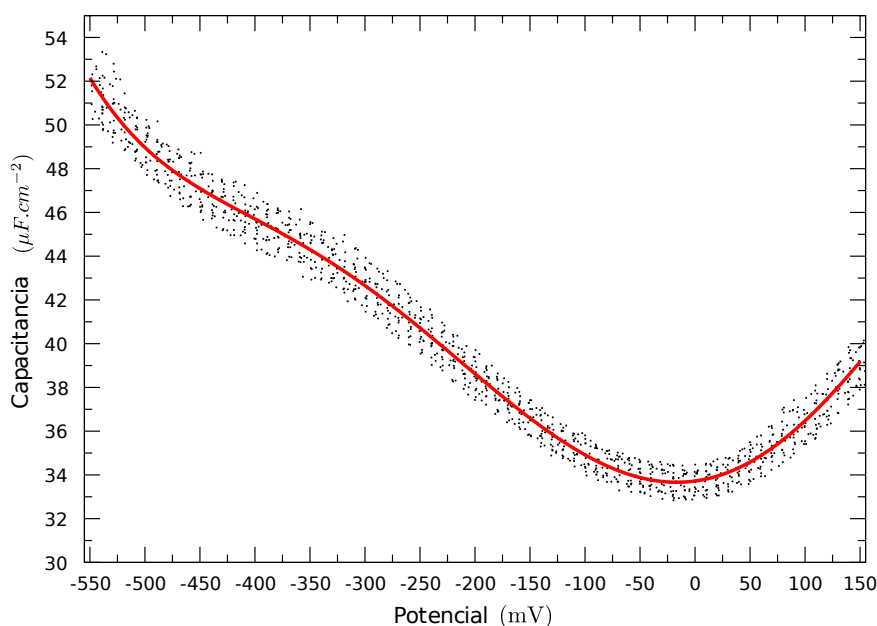


Figura III.3.8: Capacitancia medida en función del potencial aplicado (puntos negros; corresponden a los 5 ciclos de barrido) en el electrodo liso. Polinomio de grado 5 ajustado a los datos (línea roja).

Aplicando la ecuación III.3.3, se obtuvo la densidad de carga superficial del electrodo en función del potencial al integrar este polinomio, ajustando la constante de integración de forma tal que la carga sea cero al potencial de carga cero (Figura III.3.9).

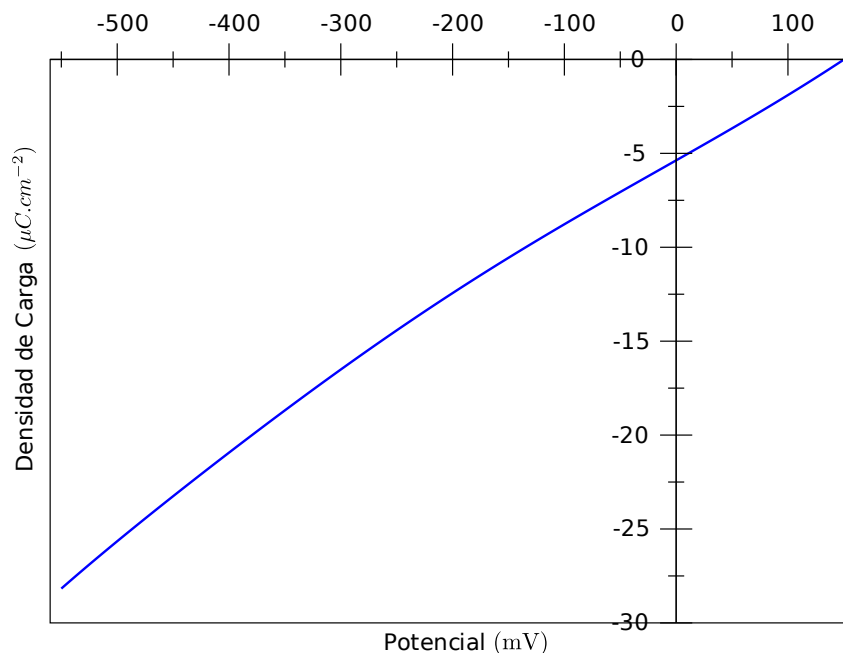
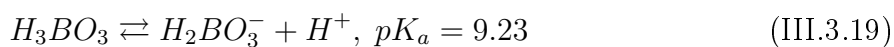
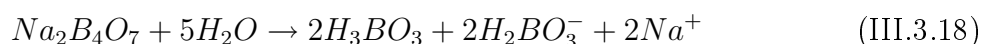


Figura III.3.9: Densidad de carga superficial del metal en función del potencial aplicado en el electrodo liso.

El bórax al disolverse en agua se disocia en los productos de la ecuación III.3.18. El equilibrio ácido-base del ácido bórico (H_3BO_3) hace que las soluciones de bórax sean una solución reguladora ideal con un pH calibrado al valor de su pK_a a 9.23.



Los electrolitos mayoritariamente presentes en la solución son el $H_2BO_3^-$ y el Na^+ . Dada la concentración analítica de bórax de 0.05 M , la concentración de estos electrolitos es $c^s = 0.1\text{ M}$ y el valor de $z = 1$, valores que se utilizaron para los cálculos siguientes.

Con la densidad de carga superficial del metal se obtuvo ϕ_2 según la ecuación III.3.10 y la capacidad de la capa difusa C_d según la ecuación III.3.11 a cada valor de potencial aplicado. Luego, utilizando la ecuación III.3.2 con la capacidad total y la capacidad de la capa difusa se obtiene la capacidad de la capa compacta. Para realizar los cálculos pertinentes es preciso conocer la constante dieléctrica relativa de la capa compacta (ϵ_r^c) o conocer el espesor de la capa compacta (x_2). Si la capa compacta está formada por agua entonces dado que los valores de ϵ_r^c deben estar entre 6 y 7 [3, página 659], y el espesor de la capa compacta entre 1.2 y

3.3 \AA^{10} según como esté dispuesta el agua en la capa compacta. Suponiendo que la variación de ϵ_r^c es más importante en función del potencial que la de x_2 se consideró a este último valor fijo en 1.2 \AA . Utilizando la ecuación III.3.4 y este valor de x_2 se puede verificar que los valores de la constante dieléctrica relativa del agua oscilan cerca los valores tabulados. El campo eléctrico en la capa compacta formada por agua se puede calcular mediante la ecuación III.3.9. Se grafican estos valores en función del potencial del electrodo de trabajo en la Figura III.3.10.

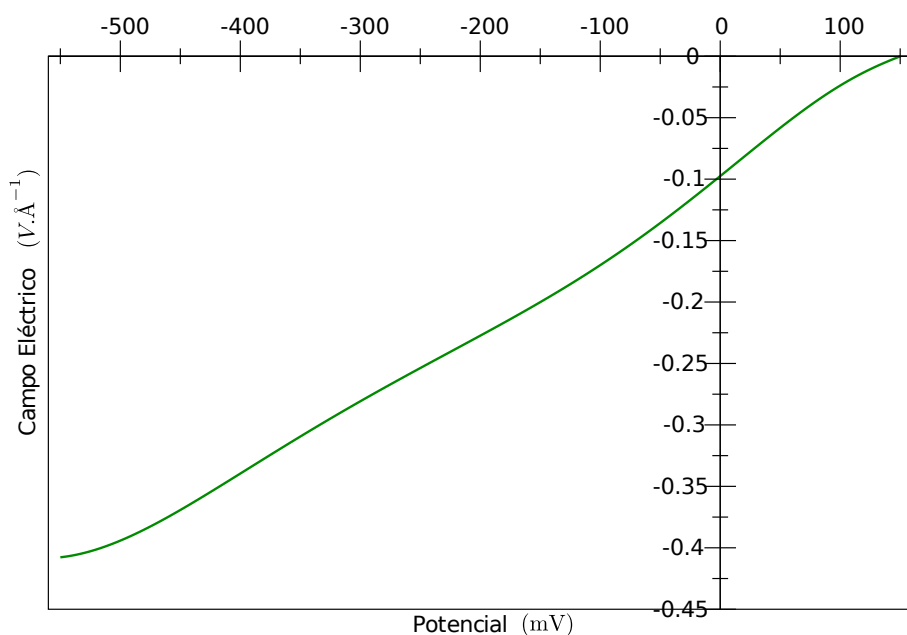


Figura III.3.10: Campo eléctrico en la capa compacta en función del potencial aplicado en el electrodo liso.

Como las mediciones de las constantes de equilibrio de coordinación de 1-metilimidazol a *ZnMes* se realizaron a los potenciales -500 , -250 y 0 mV se calculó el potencial interno y el campo eléctrico para el electrodo liso sin modificar a dichos potenciales aplicados. En la Figura III.3.11 se representan para los tres potenciales del electrodo de trabajo mencionados, el potencial eléctrico interno ϕ en función de la distancia x , calculados con la ecuación III.3.12 para la capa compacta y con la ecuación III.3.14 para la capa difusa. Con el valor del campo en la capa compacta y los valores de potencial en la capa difusa y la ecuación III.3.13, se construyó la Figura III.3.12, que representa el valor del campo eléctrico a lo largo de la distancia x para la capa compacta formada por agua para los 3 potenciales de trabajo mencionados.

¹⁰Calculado a partir de la superficie de isodensidad electrónica de la molécula cuya geometría fue optimizada utilizando métodos de DFT. La superficie de isodensidad contiene el 99 % de la densidad electrónica.

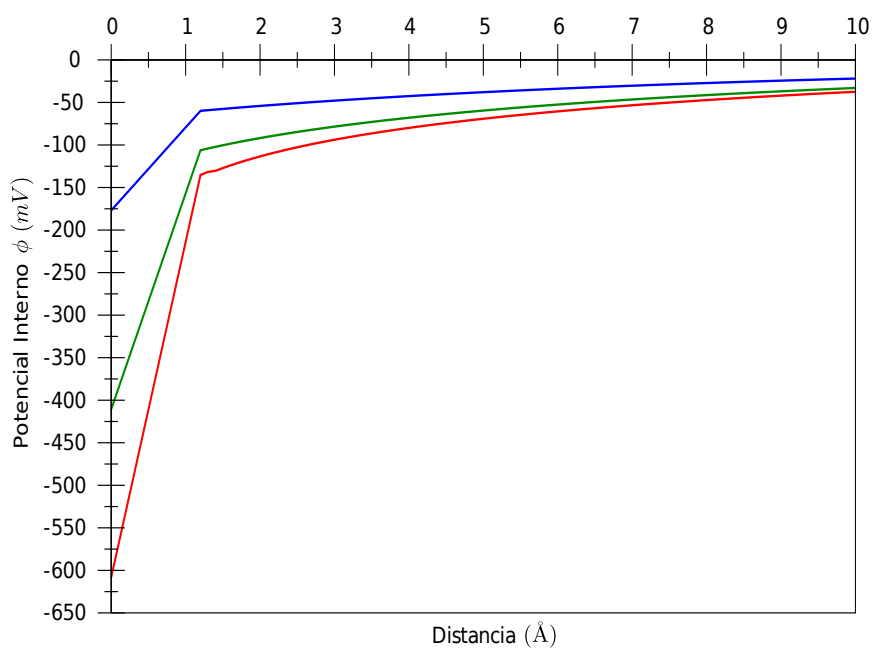


Figura III.3.11: Potencial interno a lo largo del eje x del electrodo liso sin modificar para los potenciales aplicados de -500 mV (rojo), -250 mV (verde) y 0 mV (azul).

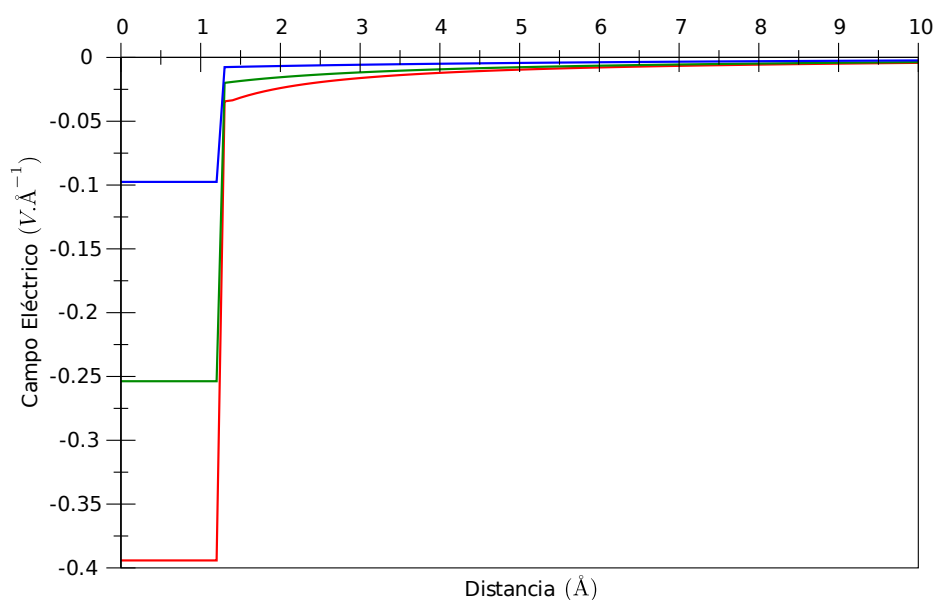


Figura III.3.12: Campo eléctrico a lo largo del eje x del electrodo liso sin modificar para los potenciales aplicados de -500 mV (rojo), -250 mV (verde) y 0 mV (azul).

El mismo procedimiento se realizó para los electrodos modificados con *ZnMes*. En la

Figura III.3.13 se muestran los valores obtenidos para la capacitancia de estos electrodos (capacidad por unidad de área).

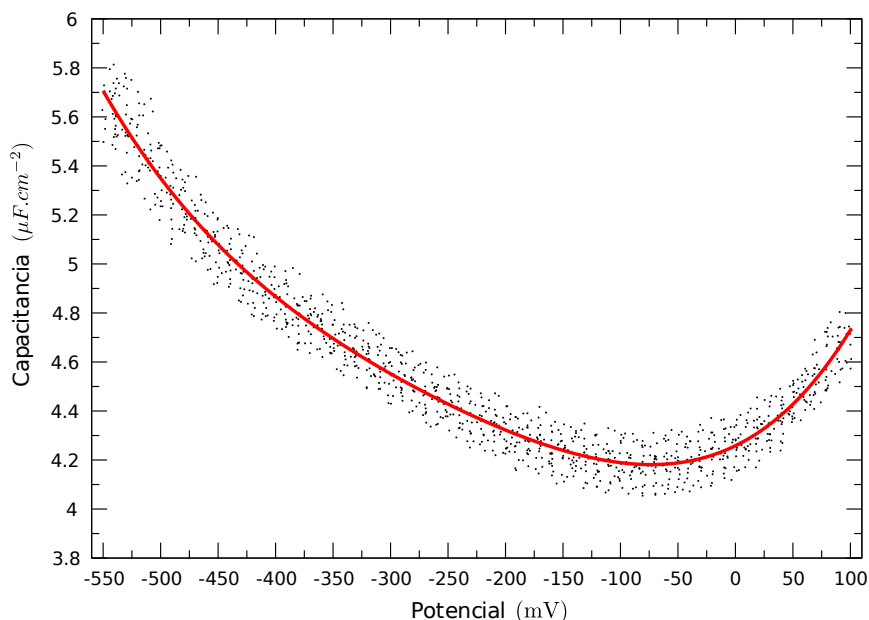


Figura III.3.13: Capacitancia medida en función del potencial aplicado (puntos negros; corresponden a los 5 ciclos de barrido) para el electrodo liso modificado con *ZnMes*. Polinomio de grado 5 ajustado a los datos (línea roja).

El valor estimado para x_2 es de 6.5 \AA^{11} , el cual corresponde a la altura de *ZnMes* suponiendo que el anillo de la porfirina se encuentra paralelo al plano del electrodo. Se obtiene con estos datos un valor de ϵ_r^c entre 3 y 4 para el rango de potencial entre -550 y 100 *mV*. Estos valores son razonables ya que se encuentran entre los valores del agua y de los compuestos orgánicos con más baja polarizabilidad que pueden llegar hasta 1.79 (referencia 3, página 667).

En la Figura III.3.14 se representa la densidad de carga superficial del electrodo liso modificado con *ZnMes* y en la Figura III.3.15 el campo eléctrico de la capa compacta en función del potencial del electrodo de trabajo. Puede notarse que tanto los valores de capacitancia, densidad de carga superficial y campo eléctrico son un orden menor que para el caso del electrodo liso sin porfirina.

¹¹Calculado a partir de la superficie de isodensidad electrónica de la molécula cuya geometría fue optimizada utilizando métodos de DFT. La superficie de isodensidad contiene el 99 % de la densidad electrónica.

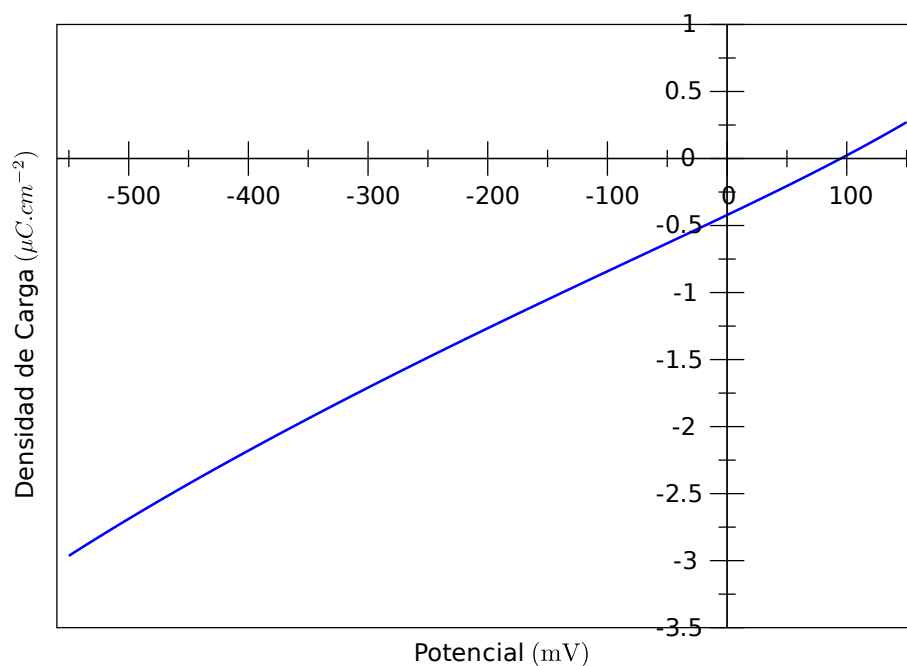


Figura III.3.14: Densidad de carga superficial del metal en función del potencial aplicado en el electrodo liso modificado con *ZnMes*.

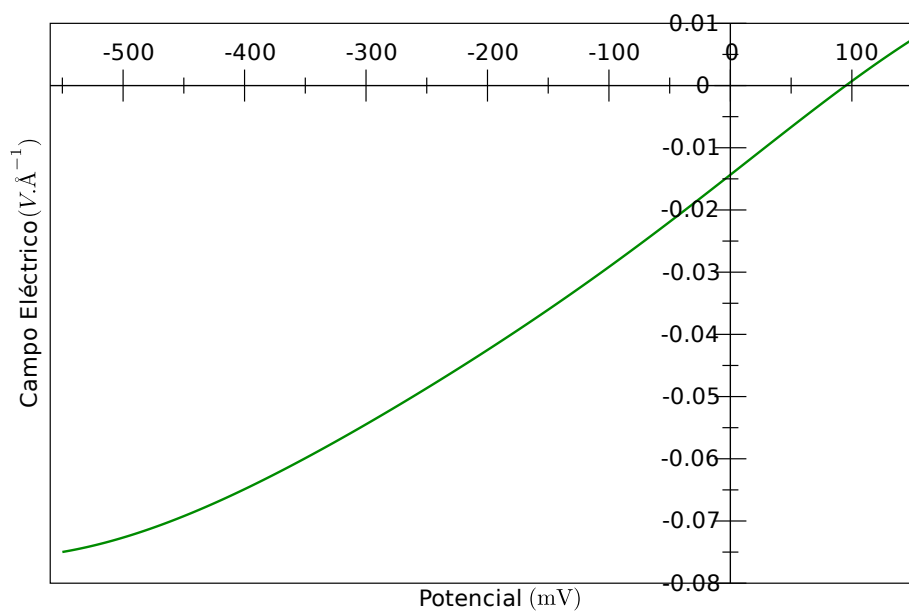


Figura III.3.15: Campo eléctrico de la capa compacta en función del potencial aplicado en el electrodo liso modificado con *ZnMes*.

El potencial interno y el campo eléctrico del electrodo liso modificado con *ZnMes* se muestran en las Figuras III.3.16 y III.3.17.

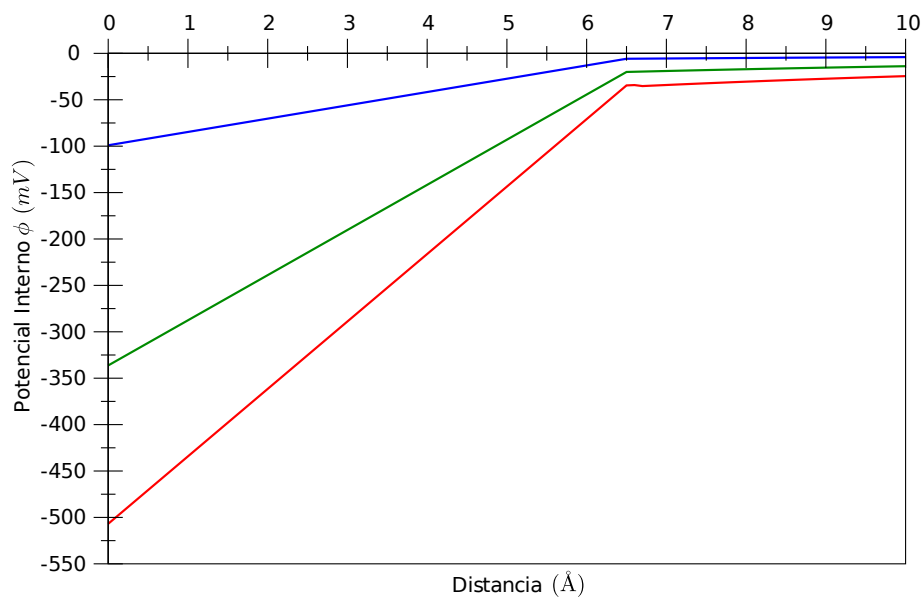


Figura III.3.16: Potencial interno a lo largo del eje x para el electrodo liso modificado con *ZnMes* para los potenciales aplicados de -500 mV (rojo), -250 mV (verde) y 0 mV (azul).

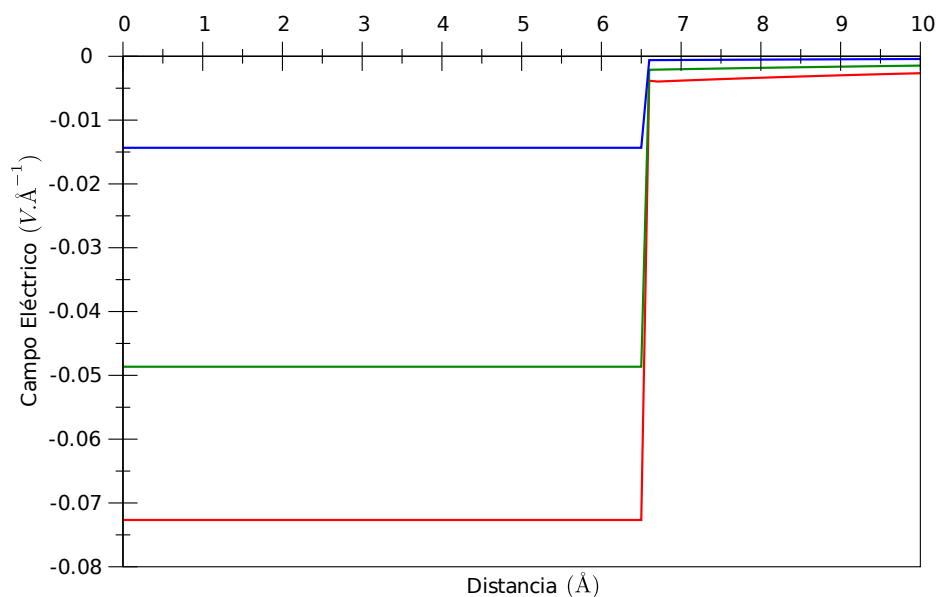


Figura III.3.17: Campo eléctrico a lo largo del eje x para el electrodo liso modificado con *ZnMes* para los potenciales aplicados de -500 mV (rojo), -250 mV (verde) y 0 mV (azul).

Es de esperar, como se muestra en las Figuras, que el campo eléctrico, la carga y la capa-

cidad sean mayores cuando la capa compacta está formada por una monocapa de agua, que cuando la forma una monocapa de porfirinas. Esto se debe especialmente al menor ancho de la capa compacta, que hace que la caída del potencial sea más abrupta produciendo un campo mayor, y por lo tanto, una carga y capacidad mayor en los electrodos (ver ecuaciones III.3.6, III.3.7 y III.3.8). En el caso del electrodo modificado con *ZnMes*, no sólo un mayor ancho de la capa compacta hace que su capacidad sea menor, sino también su menor constante dieléctrica relativa (ecuación III.3.4).

III.3.4.4. Cálculos computacionales y análisis teórico-experimental

Se calculó para la reacción de coordinación de la ecuación III.3.20 el cambio en la energía potencial electrónica, entalpía, energía libre y energía libre de solvatación en agua y cloroformo en presencia y ausencia de campos orientados positivos y negativos sobre el eje-*z* (Tabla III.3.2).

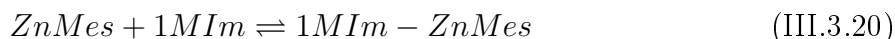


Tabla III.3.2: Energía potencial electrónica (E^c), entalpía (H^c), energía libre (G^c) y energía libre incluyendo la energía libre de solvatación en agua (G_a^c) o cloroformo (G_{cl}^c) para la reacción de coordinación. ΔX es la diferencia de energía ($X = E^c, H^c, G^c, G_a^c$ o G_{cl}^c) de la reacción a campo eléctrico nulo, y $\Delta\Delta X$ es la diferencia de energía a campo positivo o negativo respecto de la diferencia de energía a campo nulo (ej.: $\Delta\Delta E^c = \Delta E^c(F = 0.1) - \Delta E^c(F = 0)$). Energías en $kcal.mol^{-1}$. Campos Eléctricos (F) en $V.\text{\AA}^{-1}$.

	ΔX		$\Delta\Delta X$
X	$F = 0$	$F = 0.1$	$F = -0.1$
E^c	-12.85	-3.38	3.16
H^c	-11.77	-3.35	3.19
G^c	-1.26	-3.13	3.53
G_a^c	12.46		
G_{cl}^c	9.92		

Como puede verse en la Tabla, en el sistema calculado, el campo eléctrico afecta a los cambios de energías de la reacción de coordinación en el sentido observado experimentalmente en el capítulo anterior: al aplicar campos eléctricos menores (más negativos), la energía del sistema aumenta. Si bien el ΔE^c y ΔH^c son ligeramente distintos debido al efecto térmico y a la energía del punto cero, el campo eléctrico afecta de igual manera a ambos. El ΔG^c es significativamente mayor al ΔH^c de la reacción y esto se debe al cambio de entropía negativo de la reacción dado que al coordinarse el imidazol disminuyen los grados de libertad

del sistema. Sin embargo, el efecto del campo sobre el factor entrópico es bajo dado que los valores de $\Delta\Delta G^c$ son muy similares a los del $\Delta\Delta E^c$ y $\Delta\Delta H^c$. Si se utiliza la ecuación III.1.4 considerándose que el campo eléctrico es bajo se obtiene despreciando los términos superiores la ecuación III.3.21. El cambio en la energía dada por el campo eléctrico es igual a menos el producto escalar del vector del campo por la diferencia de los vectores del momento dipolar permanente de la reacción (ecuación III.3.21).

$$\Delta\Delta E \cong -\Delta\vec{\mu}^0 \cdot \vec{F} \quad (\text{III.3.21})$$

Dado que se aplicó el campo sobre el eje- z el $\Delta\mu_z^0$ para esta reacción es 2.62 *a.u.* con el cual para los valores de campo de 0.1 y -0.1 V.Å^{-1} se obtiene un $\Delta\Delta E^c$ de -3.20 y $3.20 \text{ kcal.mol}^{-1}$, respectivamente. Estos valores son muy cercanos a los obtenidos en la Tabla III.3.2 lo que significa que la aproximación utilizada en la ecuación III.3.21 es válida para este sistema. Esto indica que el cambio en todas las energías dada por el campo eléctrico se adjudica casi completamente al cambio en el momento dipolar permanente de la reacción. Si se compara el $\Delta\mu_z^0$ para la misma reacción pero con imidazol en lugar de 1-metilimidazol se obtiene un valor menor (2.38 *a.u.*) y esto se debe a que el momento dipolar del imidazol es menor que el del 1-metilimidazol. Al comparar el $\Delta\mu_z$ de la coordinación del 5-metilimidazol a la porfirina de hierro (Tabla III.1.2) se obtiene un valor mayor (2.86 *a.u.*) y esto se debe posiblemente a los diferentes metales utilizados (aunque no son completamente comparables debido a que se calcularon con distintos métodos de estructura electrónica). Debido a que los valores para ambos metales son similares es posible afirmar que para las porfirinas de hierro también exista un efecto del campo eléctrico similar sobre la constante de coordinación/disociación.

Con los campos eléctricos estimados en este capítulo para los potenciales de electrodo utilizados en el capítulo anterior y junto con estos nuevos datos es posible estimar el corrimiento de la energía debido al campo y compararlos con los experimentos del capítulo anterior. En la Tabla III.3.3 se determinaron con el $\Delta\mu_z^0$ y la ecuación III.3.21 los $\Delta\Delta E^c$ para los campos estimados a los potenciales aplicados. Puede observarse que los corrimientos esperados son mucho mayores que los corrimientos en los ΔG° determinados experimentalmente (asumiendo que el corrimiento no es causado por el efecto del campo sobre el factor entrópico según lo observado en la Tabla III.3.2). Esto podría deberse a que los campos estimados son un orden mayor a los campos efectivos que actúan sobre la reacción.

Tabla III.3.3: Comparación entre los ΔG° experimentales y los $\Delta\Delta E^c$ de la reacción de coordinación calculados para los campos eléctricos a los potenciales de electrodo aplicados en el capítulo anterior.

Potencial (mV)	Campo eléctrico ($mV.\text{\AA}^{-1}$)	$\Delta\Delta E^c$ ($kcal.mol^{-1}$)	ΔG° ($kcal.mol^{-1}$)
0	-14.3	0.459	-2.948
-250	-48.6	1.556	-2.847
-500	-72.7	2.324	-2.826

El valor de la constante de equilibrio de coordinación medida en solución se corresponde a un valor en el ΔG° de $-5.372 kcal.mol^{-1}$. Este valor es más de dos unidades de energía menor a la obtenida a 0 mV sobre la superficie. La constante de equilibrio de la reacción de coordinación medida en solución puede considerarse que fue realizada a campo nulo. Por lo tanto, según lo que se calculó en la Tabla III.3.3, el ΔG° para la reacción en solución (donde $F = 0$) debería ser a lo sumo 0.459 menor que para la reacción en superficie a 0 mV (donde $F = -14.3 mV.\text{\AA}^{-1}$), lo cual no parece ser suficiente para explicar esa diferencia.

Se consideró la posibilidad de que estas diferencias se deban a la diferencias entre los ΔS de la reacción en solución y en superficie. Sin embargo, el cambio de entropía de la reacción en superficie no es trivial de calcular dado que habría que realizar un análisis de frecuencia con los azufres de las porfirinas anclados a los átomos de oro de la superficie. Aunque este interrogante podría responderse determinando el ΔS° de la reacción experimentalmente realizando varias mediciones de la constante de equilibrio a distintas temperaturas en solución y en superficie.

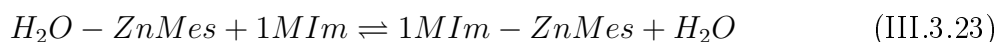
Según la Tabla III.3.2 la energía libre de solvatación en cloroformo es $2.54 kcal.mol^{-1}$ menor que en agua. Este es un valor cercano a las diferencias observadas entre las energías libres de la reacción de coordinación en solución (cloroformo) y en superficie (agua). Por lo que es muy probable que las diferencias en las constantes de equilibrio medidas en ambas condiciones se deban principalmente al efecto de la solvatación. Sin embargo, habría que tener en cuenta que la solvatación en las porfirinas adsorbidas es parcial debido a que la sección de su área exterior que está en contacto con la superficie no se encuentra solvatada. Este tipo de cálculos no se encuentra implementado en los programas que se utilizaron por lo que no se pudieron determinar.

Existe otra posibilidad que podría explicar las diferencias entre las constantes de equilibrio en solución y en superficie, y además la baja dependencia con el campo de las constantes de equilibrio en superficie. La constante de equilibrio obtenida para la reacción de coordinación en superficie se efectuó en agua. Las porfirinas de zinc pueden coordinar agua [17, 18]. A través de cálculos de estructura electrónica se determinó que el cambio de energía potencial de la reacción de coordinación de agua a $ZnMes$ (ecuación III.3.22) está energéticamente

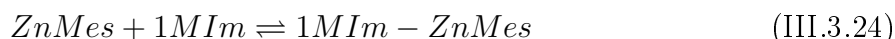
favorecido ($\Delta E = -9.74 \text{ kcal.mol}^{-1}$).



Dada la elevada concentración de agua, es posible que las porfirinas se encuentren mayoritariamente coordinadas con agua. En consecuencia, en agua, se puede estar midiendo la constante de equilibrio de la siguiente reacción:



Y la reacción que ocurre en cloroformo es:



Por lo tanto, en ambas circunstancias se podría estar determinando la constante de equilibrio de dos reacciones diferentes. Los cálculos de estructura electrónica realizados considerando ahora que la reacción es un intercambio de ligandos agua-imidazol (ecuación III.3.23) indican que esta reacción es termodinámicamente factible (Tabla III.3.4). Si éste fuera el caso, las constantes de equilibrio determinadas en ambos casos no serían comparables.

Tabla III.3.4: Diferencia de energía potencial electrónica (ΔE^i), entalpía (ΔH^i), energía libre (ΔG^i) y energía libre incluyendo la energía libre de solvatación en agua (ΔG_a^i) o cloroformo (ΔG_{cl}^i) para la reacción de intercambio de ligandos a campo eléctrico nulo. Energías en kcal.mol^{-1} .

ΔE^i	ΔH^i	ΔG^i
-3.11	-3.37	-1.72

La baja dependencia con el campo de las constantes de equilibrio en superficie podría explicarse ahora considerando que la reacción que se mide es la de intercambio. El factor principal responsable de la dependencia de las reacciones con el campo es el cambio en el momento dipolar permanente de la reacción. El $\Delta\mu_z^0$ de la reacción de intercambio es de 1.81 a.u. , lo cual indica que posee una menor dependencia con el campo que la reacción de coordinación. En la Tabla III.3.5 se estima el $\Delta\Delta E^i$ de la reacción de intercambio para los campos estimados a los potenciales aplicados.

Tabla III.3.5: $\Delta\Delta E^i$ de la reacción de intercambio estimados para los campos eléctricos presentes a los potenciales de electrodo aplicados.

Potencial (mV)	Campo eléctrico ($mV.\text{\AA}^{-1}$)	$\Delta\Delta E^i$ ($kcal.mol^{-1}$)
0	-14.3	0.32
-250	-48.6	1.07
-500	-72.7	1.60

Se observa que el cambio de energía de la reacción de intercambio tiene una menor dependencia con el campo. Sin embargo, esta dependencia sigue siendo aún demasiado alta en comparación con la dependencia determinada experimentalmente. Esto indica que este hecho no alcanza a explicar las diferencias observadas.

Es necesario comprobar estas cuestiones a través de experimentación. Un experimento posible sería determinar la constante de equilibrio en superficie en cloroformo. Para ello se requiere construir una celda de trabajo con materiales resistentes a este solvente. Los resultados de este experimento podrían compararse con los medidos en solución debido a que la reacción a medir sería la misma y el efecto de solvatación similar. Se podría observar si la dependencia con el campo es la misma y si las constantes de equilibrio son comparables en orden magnitud. De esta manera sería posible identificar los factores que ocasionan las diferencias actualmente observadas.

La baja dependencia observada del cambio en la energía libre asociado a la reacción con el campo eléctrico podría ser ocasionada por la disposición de las porfirinas sobre la superficie. Debido a las irregularidades de la superficie de la plata rugosa, las porfirinas podrían estar orientadas predominantemente con el plano de sus anillos casi perpendicular al plano de la superficie del metal. Esto produciría que la componente del campo (F_p) sobre el eje perpendicular al plano del anillo de la porfirina (eje- p) fuese menor al esperado para la porfirina con el plano del anillo paralelo al plano de la superficie del metal. Este eje es el más relevante dado que posee la mayor componente del vector del cambio en el momento dipolar permanente de la reacción ($\Delta\mu_p^0$) y además porque sobre este eje se encuentra situada la coordenada de la reacción. Al ser el campo efectivo que actúa sobre el eje- p (F_p) menor, también lo es la dependencia del campo sobre el cambio en la energía potencial asociada a la reacción ($\Delta\Delta E; \Delta\Delta E \cong -\Delta\mu_p^0 \cdot F_p$). La disposición de las porfirinas sobre la superficie de electrodos de plata rugosa es un factor crucial para poder explicar las discrepancias teórico-experimentales de la dependencia con el campo de los parámetros energéticos asociados a la reacción. Este factor queda pendiente para ser estudiado experimentalmente.

III.3.5. Conclusiones

El máximo valor absoluto de campo eléctrico fue obtenido a -500 mV en la monocapa de aguas (394 mV.Å^{-1}). Para el caso de *ZnMes* fue menor (72.7 mV.Å^{-1}) y esto se debió principalmente al mayor ancho de la monocapa de porfirina. Las diferencias en las constantes de equilibrio medidas en superficie y en solución podrían deberse al efecto de la solvatación producidos por los distintos solventes utilizados en cada caso. Otra posibilidad es que se estén midiendo dos reacciones diferentes dado que en superficie la porfirina puede tener un agua coordinada al metal. El efecto del campo eléctrico experimental en la energía libre de coordinación parece ser menor al estimado por cálculos de estructura electrónica. Esto posiblemente se deba a que el cambio en el momento dipolar permanente de la reacción sea menor debido a que se está midiendo la reacción de intercambio de ligandos agua-imidazol en lugar de la reacción de coordinación. Otro factor crucial podría ser que el campo eléctrico efectivo sea un orden de magnitud menor al estimado debido a que la disposición de las porfirinas sobre la superficie no sería la esperada. Sin embargo, la tendencia de que aumente el ΔG° de la reacción de coordinación con una disminución en el potencial/campo eléctrico fue la predicha por los cálculos.

III.3.6. Bibliografía

- [1] Paul Delahay. *Double Layer and Electrode Kinetics*. Interscience Publishers, 1966.
- [2] D. C. Grahame. The Electrical Double Layer and the Theory of Electrocapillarity. *Chemical Reviews*, 41:441, 1947.
- [3] M. A. V. Devanathan y B. V. K. S. R. A. Tilak. The Structure of the Electrical Double Layer at the Metal-Solution Interface. *Chemical Reviews*, 65(6):635–684, 1965.
- [4] L. M. Doubova y S. Trasatti. Effect of the molecular structure on the adsorption of nitriles on Ag single crystal face electrodes: iso-valeronitrile vs. acetonitrile. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 550-551:33–40, 2003.
- [5] H. M. Rojhtantalab y G. L. Richmond. Characterization of the Silver/Aqueous Electrolyte Interface by Optical Second Harmonic Generation and Differential Capacitance. *Journal of Physical Chemistry*, 93(8):3269–3275, 1989.
- [6] A. Kudelski y W. Hill. Raman Study on the Structure of Cystamine Monolayers on Silver. *Langmuir*, 15:3162–3168, 1999.
- [7] A. D. Becke. *Physical Review A*, 38:3098, 1988.
- [8] A. D. Becke. *The Journal of Chemical Physics*, 98:5648, 1993.
- [9] A. D. Becke. *The Journal of Chemical Physics*, 98:1372, 1993.
- [10] M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, J. A. Montgomery, Jr., T. Vreven, K. N. Kudin, J. C. Burant, J. M. Millam, S. S. Iyengar, J. Tomasi, V. Barone, B. Mennucci, M. Cossi, G. Scalmani, N. Rega, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, M. Klene, X. Li, J. E. Knox, H. P. Hratchian, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, P. Y. Ayala, K. Morokuma, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, V. G. Zakrzewski, S. Dapprich, A. D. Daniels, M. C. Strain, O. Farkas, D. K. Malick, A. D. Rabuck, K. Raghavachari, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, Q. Cui, A. G. Baboul, S. Clifford, J. Cioslowski, B. B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R. L. Martin, D. J. Fox, T. Keith, M. A. Al-Laham, C. Y. Peng, A. Nanayakkara, M. Challacombe, P. M. W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M. W. Wong, C. Gonzalez, y J. A. Pople. *Gaussian 03*. Revision C.02, Gaussian, Inc., Wallingford, CT, 2004.

- [11] M. M. Walczak, D. D. Popenoe, R. S. Deinhammer, B. D. Lamp, C. Chung, y M. D. Porter. Reductive Desorption of Alkanethiolate Monolayers at Gold: A Measure of Surface Coverage. *Langmuir*, 7:2687–2693, 1991.
- [12] M. Wirde y U. Gelius. *Langmuir*, 15:6370–6378, 1999.
- [13] J. T. Hupp, D. Larkin, y M. J. Weaver. Specific Adsorption of Halide and Pseudohalide ions at Electrochemically roughened versus smooth silver-aqueous interfaces. *Surface Science*, 125:429–451, 1983.
- [14] G. L. Richmond. Characterization of the Silver-Aqueous Electrolyte Interface by Optical Second Harmonic Generation. *Langmuir*, 2:132–139, 1986.
- [15] A. Lukomska y J. Sobkowski. Adsorption of thiourea on monocrystalline silver electrodes in neutral solution. *Electrochimica Acta*, 51:2247–2254, 2006.
- [16] A. N. Frumkin. *Elektrochem.*, 59:807, 1955.
- [17] H. Imai, H. Munakata, A. Takahashi, S. Nakagawa, Y. Ihara, y Y. Uemori. Amine binding to water-soluble zinc porphyrins bearing a hydrophobic binding pocket. *Journal of the Chemical Society Perkin Transactions 2*, pages 2565–2568, 1999.
- [18] A. J. Golder, D. C. Povey, J. Silver, y Q. A. A. Jassim. Structure of Aqua(tetraphenylporphyrinato)zinc(II) a Redetermination. *Acta Crystallographica*, C46:1210–1212, 1990.

III.4

Estimación del campo eléctrico usando el efecto Stark vibracional

III.4.1. Introducción

Las interacciones electrostáticas son claves para comprender las propiedades de sistemas moleculares complejos como las proteínas. Existen un gran número de estudios teóricos dirigidos a la comprensión del rol jugado por la electrostática en el plegamiento, ensamblado y catálisis. Las interacciones electrostáticas pueden ser determinadas midiendo el desplazamiento del pK_a en residuos titulables, corrimientos en potenciales redox, el desplazamiento químico de RMN y electrocrómico de bandas a veces llamado desplazamiento Stark interno. El desplazamiento electrocrómico de bandas en una proteína es el resultado de la interacción entre un cromóforo sonda y el campo eléctrico debido al entorno de la matriz de la proteína, al grupo prostético y el solvente asociado. Este campo colectivo es conocido como la matriz del campo eléctrico.[1] Existen varios trabajos donde se determinan a través de cálculos teóricos las magnitudes de estos campos dentro del sitio activo de varias proteínas [1, 2, 3, 4, 5]. Los cambios en la matriz del campo eléctrico en una proteína pueden ser causados por mutaciones o fluctuaciones estructurales internas o también por cuestiones externas como la cercanía de la proteína a membranas biológicas. Estos cambios en la matriz del campo eléctrico pueden producir cambios en las frecuencias vibracionales de cromóforos detectables por espectroscopías RAMAN e IR. Al desplazamiento que induce el campo eléctrico sobre la frecuencia de los modos vibracionales de una molécula se lo conoce como efecto Stark vibracional. Una estrategia utilizada para detectar estos cambios en el campo eléctrico local ha sido a través del efecto Stark introduciendo moléculas diatómicas como el CO, NO y CN^- coordinadas al hierro de hemoproteínas que sirven como sondas Stark [6, 1, 3, 4]. Sin embargo, al coordinar estas sondas Stark en los grupos Hemos se está afectando la estructura

y función de la proteína nativa a estudiar. El reemplazo de los sustituyentes de los anillos porfirínicos de las hemoproteínas por grupos que sirven como sondas de campos eléctricos podría ser una estrategia para revelar las interacciones electrostáticas de la misma sin perturbar significativamente su estructura o función. A la relación entre el desplazamiento de las frecuencias vibracionales con la magnitud del campo que lo provoca cuando éste tiende a cero se lo conoce como coeficiente de variación Stark (*Stark Tuning Rate*). Para lograr correlacionar el campo con el desplazamiento de la frecuencia vibracional medido es necesario conocer este coeficiente.

En este capítulo se ha estudiado, utilizando metodologías *ab-initio* y basadas en la teoría del funcional de la densidad (DFT), el efecto Stark de una porfirina sustituida en la posición meso por un grupo ciano (CN) para calibrar el desplazamiento vibracional del modo de estiramiento CN con la intensidad y orientación del campo. Relacionado con lo anterior, se ha sintetizado una porfirina biológicamente relevante con un grupo –CN en distintas posiciones meso del anillo porfirínico. Se analizará la factibilidad de estimar el campo eléctrico en la superficie de electrodos de plata utilizando el efecto Stark vibracional con el que se puede obtener información relativa del campo eléctrico en la proximidades de la superficie del metal. Para esto se requiere conocer a priori la función de este corrimiento con el campo eléctrico, que a intensidades de campos bajos es aproximadamente lineal.

III.4.2. Teoría

El efecto Stark puede observarse para todos los tipos de espectroscopías [7]. En la espectroscopia vibracional, el efecto Stark vibracional está dado por el corrimiento de las frecuencias vibracionales inducidos por un campo eléctrico estático. Estos corrimientos se originan en las perturbaciones inducidas por el campo eléctrico sobre la configuración electrónica y nuclear que cambian las constantes de fuerza de las vibraciones y por consiguiente sus frecuencias. Se puede expresar la dependencia de la frecuencia de un modo vibracional ν con el campo eléctrico F como una serie de Taylor para campos cercanos a cero, ecuación III.4.1:

$$\nu = \nu_0 + \left(\frac{\partial \nu}{\partial F} \right)_{F=0} F + \frac{1}{2!} \left(\frac{\partial^2 \nu}{\partial F^2} \right)_{F=0} F^2 + \dots \quad (\text{III.4.1})$$

donde ν_0 es la frecuencia vibracional a campo eléctrico nulo. La derivada de la frecuencia vibracional respecto al campo eléctrico cuando este tiende a cero se la denominará por su nombre en inglés como *Stark Tuning Rate* (σ) (ecuación III.4.2) [8].

$$\sigma = \left(\frac{\partial \nu}{\partial F} \right)_{F=0} \quad (\text{III.4.2})$$

A valores de campos eléctricos relativamente bajos, el corrimiento de la frecuencia vibracional es aproximadamente lineal y se puede utilizar la expansión de Taylor de primer orden de la frecuencia para describirlo.

Los valores de σ se suelen medir, por ejemplo, para modos vibracionales que involucran el estiramiento de grupos funcionales comúnmente utilizados como sondas Stark (CN , CO , NO) [6, 3], utilizando espectroscopía IR de moléculas disueltas en solventes no conductores aplicando potenciales entre dos placas paralelas conductoras muy cercanas entre si de manera de generar campos eléctricos conocidos y homogéneos [9, 10, 2].

En el presente apartado se pretende obtener un valor de campo eléctrico a partir de σ y del corrimiento en la frecuencia de un modo vibracional ($\Delta\nu = \nu - \nu_0$) obtenido experimentalmente. Se determinó el $\Delta\nu$ del estiramiento del grupo CN que se encuentra en la posición meso de una porfirina (Hemina IX) utilizando la técnica SERRS. Paralelamente, se estimó σ utilizando cálculos de DFT y análisis de frecuencias.

Una vez obtenidos σ y $\Delta\nu$ se procederá a calcular el campo eléctrico suponiendo que el corrimiento de las frecuencias en presencia de los campos eléctricos de los experimentos sigue una relación lineal.

III.4.3. Métodos

III.4.3.1. Determinación del coeficiente de variación Stark

Los cálculos se realizaron utilizando metodologías basadas en la teoría del funcional de la densidad. Se utilizaron dos funcionales de intercambio y correlación distintos para evaluar los efectos del campo eléctrico en las frecuencias de estiramiento. Uno de ellos fue el funcional de Perdew, Burke y Ernzerhof (PBE) [11, 12] y el otro fue el funcional híbrido de tres parámetros de Becke con el funcional de correlación de Lee, Yang y Parr (B3LYP) [13, 14, 15]. Todos los cálculos se hicieron con el paquete de programas de Gaussian 03 [16]. Las funciones de base utilizadas fueron SDD, SDDall, TZV, 6-31G, 6-31G*, 6-31G**, 6-311++G**, 6-311++G(2d,2p).

Se calculó el STR (σ) de la frecuencia vibracional del modo que corresponde al estiramiento del grupo funcional CN unido en la posición meso de una porfirina sin metal, con $Fe(III)$, $Fe(II)$ y con Zn . El grupo CN fue elegido como sonda Stark debido a que su estiramiento es activo tanto en Raman como en IR y además su frecuencia vibracional se encuentra alejada de las frecuencias de las porfirinas evitando así superposición de bandas. También se calculó el STR del acetonitrilo, metacrilonitrilo, benzonitrilo y 4-clorobenzonitrilo para escoger los mejores funcionales y funciones de base a utilizar debido a que se dispone de valores experimentales de sus STR y frecuencias vibracionales. La carga y la multiplicidad

de espín de todas las especies calculadas respectivamente fue de 0 y 1, a excepción de las metaloporfirinas de Fe(II) que fue de 0 y 3 y la de Fe(III) que fue de 1 y 4. La multiplicidad de espín de las metaloporfirinas se determinaron calculando los primeros 3 estados de multiplicidad y luego escogiendo el más estable energéticamente.

Se obtuvo el STR por medio del estimador de la ecuación III.4.3 que provee valores confiables dentro de rangos donde la dependencia de la frecuencia con el campo se puede describir con un polinomio de segundo grado (Figura V.6.2 del Apéndice).

$$\sigma = \frac{\nu(F) - \nu(-F)}{2F} \quad (\text{III.4.3})$$

De esta manera se reduce el costo del cálculo ya que se obtiene σ con sólo dos cálculos de frecuencias obtenidas aplicando la misma intensidad de campo en un sentido y en el opuesto. La intensidad de campo aplicado F fue de 0.1 V.Å^{-1} . Previamente se testeó que dentro de estos valores de campos se cumpla con los requisitos del estimador en sistemas modelo pequeños.

En un principio los cálculos se realizaron optimizando las geometrías de las moléculas en vacío. Posteriormente, se aplicó el campo eléctrico optimizando las geometrías nuevamente y realizando el análisis de frecuencias en presencia del mismo campo. Los campos fueron aplicados en forma paralela (eje x) y perpendicular (eje z) a la unión CN . El eje z además pasa por el vector perpendicular al plano formado por los carbonos de las especies excepto para el acetonitrilo cuyo plano está definido por sus dos carbonos y uno de los hidrógenos. Se considera que el campo es positivo cuando se aplica en la dirección $N \rightarrow C$ para el eje x y para el eje z es indistinto ya que es perpendicular al plano de simetría de las moléculas.

III.4.3.2. Medición del corrimiento vibracional

Una mezcla de 3 isómeros de mesocianohemina IX en las posiciones indicadas en la Figura III.4.1 con los carboxilatos esterificados fue sintetizada por Suárez, S. et al. Se procedió a la hidrólisis de los mismos colocando 2 mg de porfirina en una solución de cloroformo (0.5 ml), tetracloruro de carbono (2 ml) y iodomethylsilano (Me_3SiI) (0.1 ml) por 30 minutos [17]. Se cortó la reacción con agua miliQ. La fase orgánica fue extraída y se evaporó el solvente con una corriente de nitrógeno. El sólido (porfirina desesterificada) fue lavado con agua y secado. Posteriormente, se prepararon electrodos de plata rugosos con cisteamina adsorbida químicamente según se describe en los métodos del capítulo anterior. Paralelamente, se preparó una solución de N-hidroxisuccinimida y N,N'-diciclohexilcarbodiimida en etanol la cual fue agregada a la porfirina hidrolizada. Se sumergieron los electrodos en esta solución para que los carboxilatos de la porfirina se unieran a los aminos de la cisteamina covalentemente unida a los electrodos por medio de la reacción de amidación catalizada por

la N-hidroxisuccinimida y N,N'-diciclohexilcarbodiimida. Los electrodos fueron incubados en esta solución por 48 horas y luego lavados con etanol y agua miliQ. Durante las mediciones Raman los electrodos fueron sumergidos en una solución acuosa de bórax 0.05 M, *pH* 9.23 y en ausencia de oxígeno. Se utilizaron electrodos de plata en forma de anillo. Se hizo girar al electrodo durante las mediciones de manera de evitar la sobreexposición al láser para reducir la fotodescomposición de la muestra. La longitud de onda del láser utilizado fue de 413.138 nm y la potencia de haz que incide sobre la celda fue de 250 μW . El electrodo de referencia y contraelectrodo fue el mismo que en III.3.3.1. Los potenciales aplicados fueron constantes entre -500 y 0 mV respecto al electrodo de referencia. Cada espectro SERRS se tomó acumulando durante 60 segundos y promediando 2 acumulaciones. Se utilizó un rejilla con 1200 rendijas y un *binning* de 1. El alineamiento del equipo Raman se realizó maximizando la señal de una referencia de silicio. Se calibró el espectrómetro utilizando la línea de 435.833 nm de la luz de mercurio.

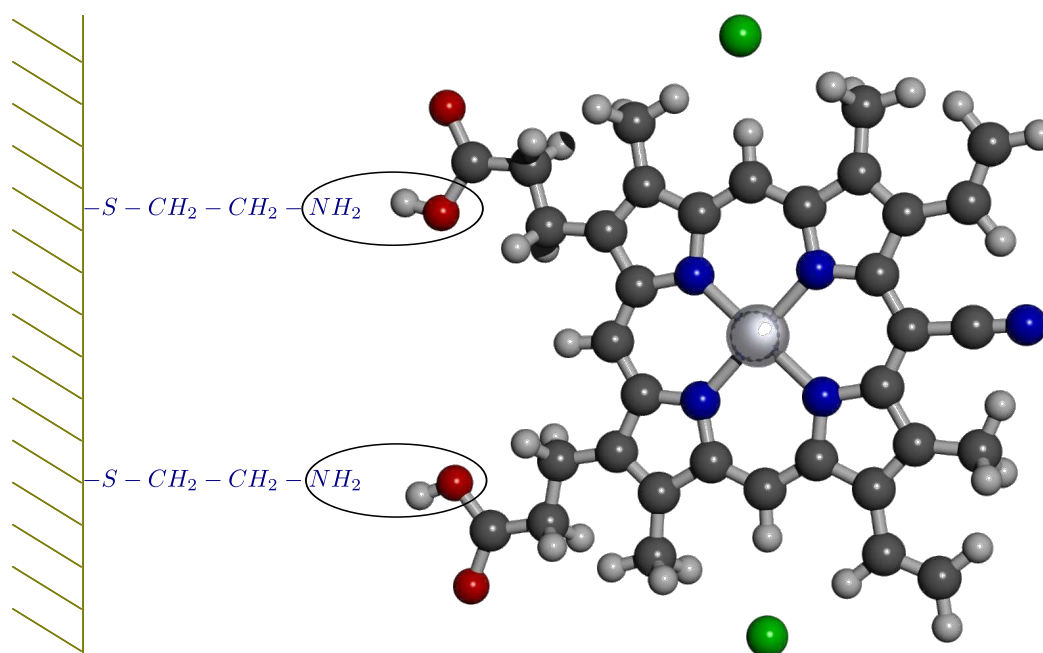


Figura III.4.1: Estructura de la mesocianohemina IX desesterificada y su modo de unión a la superficie de plata. Las esferas verdes indican las otras posiciones donde se encuentra el grupo CN en los distintos isómeros.

III.4.4. Resultados y Discusión

III.4.4.1. Determinación del coeficiente de variación Stark

En principio, se calcularon distintas especies $R-CN$ que se eligieron según el tipo de sustituyente R y se muestran en la Figura III.4.2. Se probaron para estos casos distintos

funcionales y funciones de base con el objeto de escoger los más apropiados para utilizar en los cálculos donde R es una porfirina.

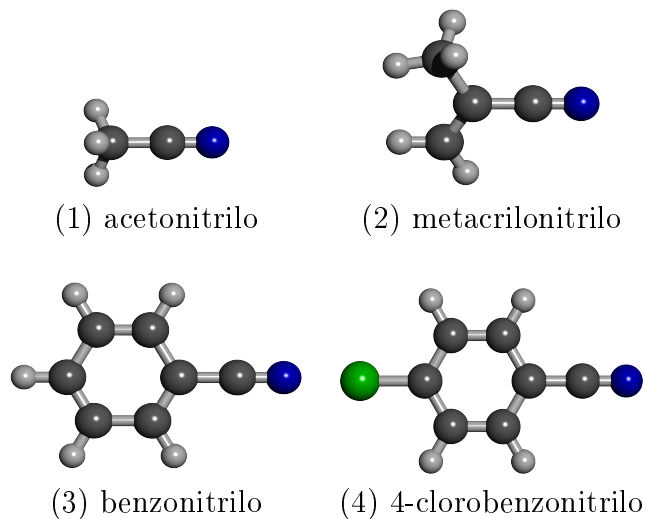


Figura III.4.2: Especies $R-CN$ calculadas.

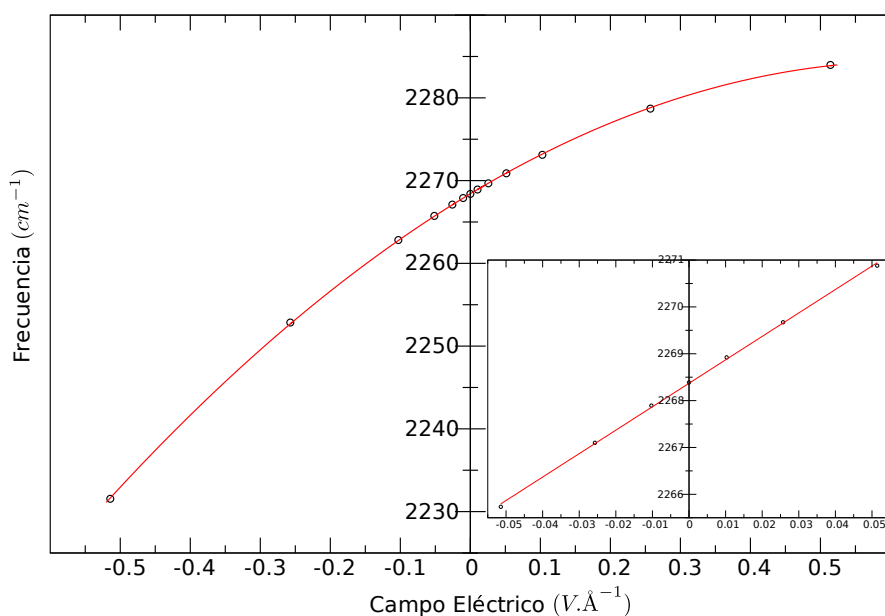


Figura III.4.3: Frecuencia de estiramiento $C-N$ del 4-clorobenzonitrilo en función del campo eléctrico aplicado sobre el eje x (B3LYP-TZV).

Para el caso de 4-clorobenzonitrilo se calculó la frecuencia vibracional del estiramiento $C-N$ a distintas magnitudes de campo en la dirección x . En la Figura III.4.3 se puede ver que hasta un campo de $0.5 V \cdot \text{\AA}^{-1}$ la dependencia de la frecuencia con el campo sigue una

tendencia que puede ser descripta con un polinomio de segundo grado con un coeficiente de correlación para el ajuste de 0.999982 lo cual hace válido el uso del estimador propuesto para σ . Para valores de campo entre $\pm 0.05 \text{ V.Å}^{-1}$ la frecuencia sigue una tendencia lineal que para este caso tiene un coeficiente de correlación de 0.9997 (Figura III.4.3). En la Tabla III.4.1 se muestran los valores de σ calculados para campos aplicados sobre el eje x de las especies de la Figura III.4.2.

Tabla III.4.1: STR de $R-CN$ utilizando distintos funcionales y funciones de base. Unidades en $\frac{\text{cm}^{-1}}{\text{V.Å}^{-1}}$. † Valores Experimentales de Dalosto et al. [6].

	PBEPBE				B3LYP			
	(1)	(2)	(3)	(4)	(1)	(2)	(3)	(4)
SDD	24.9	30.8	38.9	42.3	28.6	36.3	45.7	47.7
SDDall	20.2	25.9	32.8	34.4	24.1	31.5	39.7	40.2
TZV	26.2	32.3	41.1	44.9	29.8	37.5	47.7	50.1
6-31G	22.4	28.1	35.4	38.1	25.7	32.6	41.1	42.7
6-31G*	20.5	24.9	31.9	35.1	23.4	28.9	36.9	39.5
6-31G**	20.4	24.8	31.5	35.0	23.4	28.8	36.8	39.4
6-311++G**	25.3	31.1	40.1	45.0	28.8	35.9	46.1	50.1
6-311++G(2d,2p)	23.9	29.0	38.3	43.3	27.4	33.8	44.3	48.5
Valor Experimental†					43.0	-	-	58.0

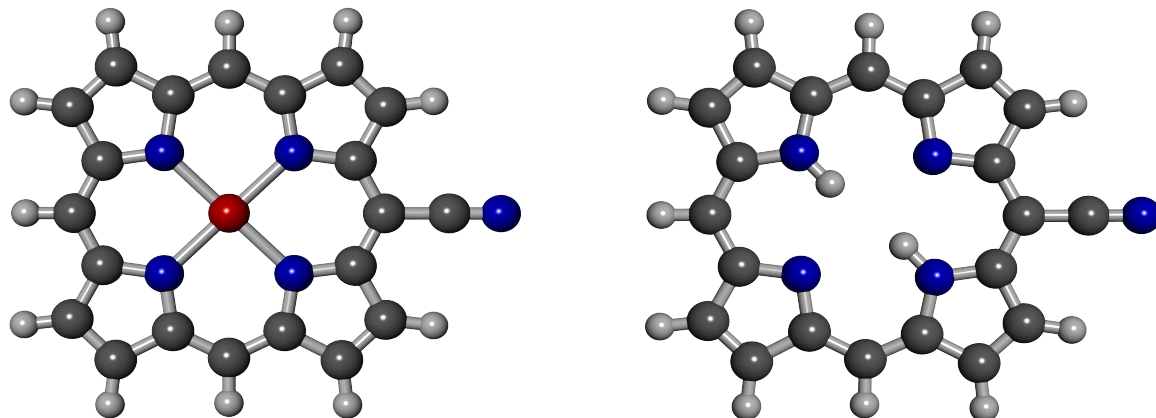
Los STR calculados para estas especies cuando el campo se aplica sobre el eje z son nulos. Esto ocurre debido a la simetría presente, la que hace totalmente equivalente el corrimiento de las frecuencias y energía si el mismo campo se aplica en un sentido o en el opuesto. Como se puede observar en la Tabla III.4.1 y en otros trabajos (18, 6) los valores calculados para σ tienden a subestimar los valores experimentales. Los STR calculados con el funcional PBEPBE son siempre menores que los obtenidos con B3LYP. Las funciones de base más completas que tienen funciones de polarización y difusas (6-311++G** y 6-311++G(2d,2p)) dan buenos resultados pero tienen un mayor costo computacional que las SDD y TZV que predicen resultados similares.

Tabla III.4.2: STR de mesocianoporfirinas (B3LYP, TZV).

	$\sigma \left(\frac{\text{cm}^{-1}}{\text{V.Å}^{-1}} \right)$
<i>apo-mesocianoporfirina</i>	78.8
<i>[Fe(III)-mesocianoporfirina]⁺</i>	37.2
<i>Fe(II)-mesocianoporfirina</i>	65.0
<i>Zn(II)-mesocianoporfirina</i>	78.2

La función de base TZV es la que provee valores menos subestimados a un menor costo

computacional por lo cual resultó ser la base elegida junto con el funcional B3LYP para realizar los cálculos con las porfirinas.



mesocianoporfirinas de $Zn(II)$, $Fe(II)$ y $Fe(III)$

apo-mesocianoporfirina

Figura III.4.4: mesocianoporfirinas calculadas.

En la Figura III.4.4 se muestran las estructuras de las porfirinas calculadas y en la Tabla III.4.2 sus STR. En las porfirinas es mayor el STR que en los sistemas más pequeños calculados. En presencia de hierro tiende a disminuir el STR y aún más cuando el estado de oxidación es mayor ($Fe(III)$). Llamativamente, el $Zn(II)$ no afecta significativamente el STR. El efecto del sustituyente R afecta de manera importante el STR del grupo CN. Se produce un aumento del STR cuando el carbono donde está el grupo CN tiene un mayor número de carbonos unidos, más dobles enlaces o se encuentra en un sistema aromático mayor, en ese respectivo orden. La razón por la que ocurre esto probablemente radique en la polarizabilidad electrónica de este carbono ya que al aumentar la polarizabilidad aumenta la transferencia de carga inducida por el campo eléctrico hacia la unión $C-N$, permitiendo que los cambios en la constante de fuerza de la unión sean más abruptos con la variación del campo. Dentro del nivel de la aproximación armónica, la variación de la frecuencia con el campo cumple con la siguiente igualdad:

$$h\Delta\nu = h\nu(F) - h\nu(0) = -\Delta\mu \cdot F - \frac{1}{2}F \cdot \Delta\alpha \cdot F + \dots \quad (III.4.4)$$

donde $\Delta\mu$ es el cambio en el momento dipolar, $\Delta\alpha$ el cambio en la polarizabilidad con el campo, y h es la constante de Planck [8]. Si se supone estar dentro de esta aproximación se tiene que $\Delta\mu$ es proporcional al STR y que según la ecuación III.1.1 y III.4.1 se deduce que:

$$-h\sigma = \Delta\mu = \mu(F) - \mu(0) \cong \alpha \cdot F \quad (III.4.5)$$

siendo α la polarizabilidad de la molécula lo cual es consistente con la explicación cualitativa

que se dio.

El grupo CN es una sonda Stark apropiada que mostró poseer un importante STR especialmente en porfirinas. Los resultados aquí presentados indican que es posible obtener información de la orientación del campo ya que el efecto es especialmente intenso en la dirección paralela a la unión CN no siendo así en las direcciones perpendiculares.

III.4.4.2. Medición del corrimiento vibracional

Inicialmente se aplicó un potencial de -500 mV para reducir las posibles porfirinas oxidadas ($Fe(III) \rightarrow Fe(II)$) mostrando un cambio en el espectro de la porfirina con corrimientos de bandas que se corresponden con este proceso. Posteriormente, se aplicaron distintos potenciales constantes mientras se tomaron espectros Raman de la porfirina. En la Figura III.4.5 se muestran los espectros completos tomados para la porfirina unida covalentemente al electrodo a los potenciales -500 , -375 , -250 , -125 y 0 mV .

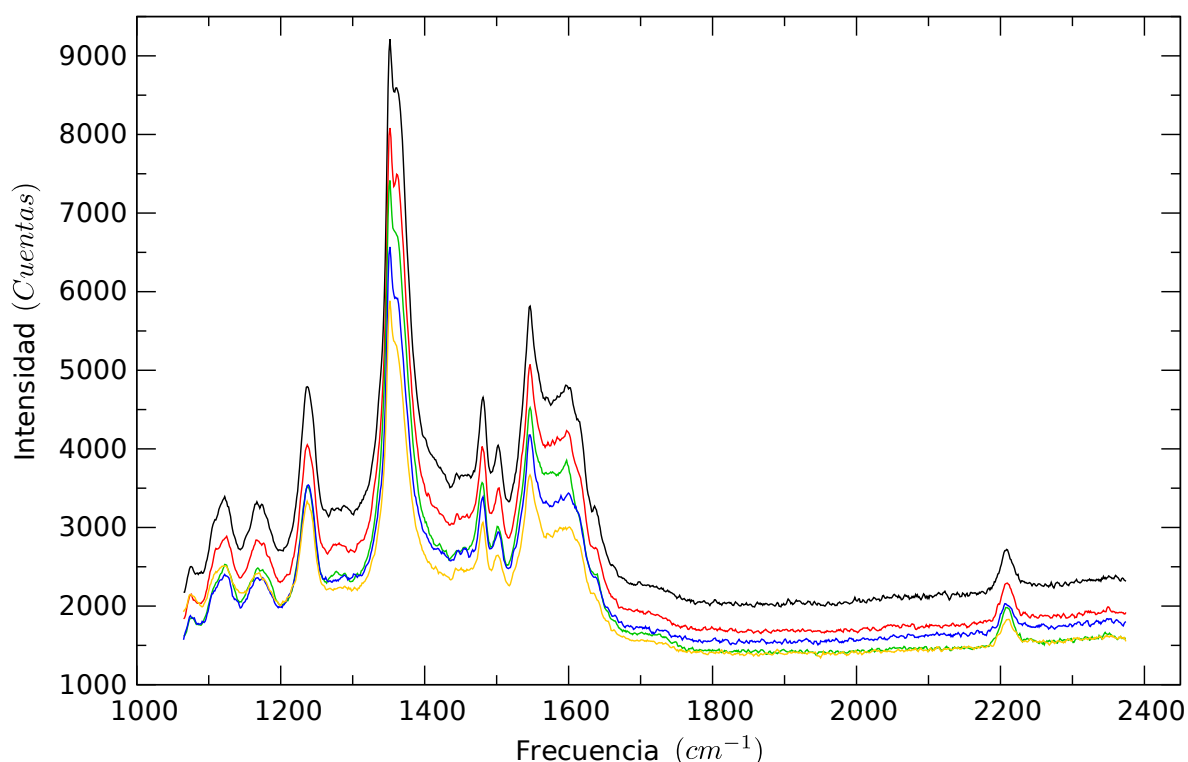


Figura III.4.5: Espectros SERRS de mesocianohemina IX inmovilizada sobre un electrodo de plata a -500 mV (negro), -375 mV (rojo), -250 mV (verde), -125 mV (azul), 0 mV (naranja).

Se observó que la aplicación de distintos potenciales produjo un corrimiento de la línea

de base pero sin perturbar la forma y la intensidad relativa de las bandas. La porfirina tiene las bandas más intensas entre 1000 y 1700 cm^{-1} y una banda muy alejada a 2210 cm^{-1} que corresponde al modo que involucra el estiramiento $C - N$. Esta frecuencia es cercana a la calculada para la porfirina modelo de 2250 cm^{-1} (B3LYP, TZV) y coincide con la banda observada del compuesto sólido en el IR de 2208 cm^{-1} (medido por Suárez, S. et al.) y en el Raman de 2209.58 cm^{-1} . En la Figura III.4.6 se muestra la zona espectral de esta banda amplificada a cada potencial aplicado.

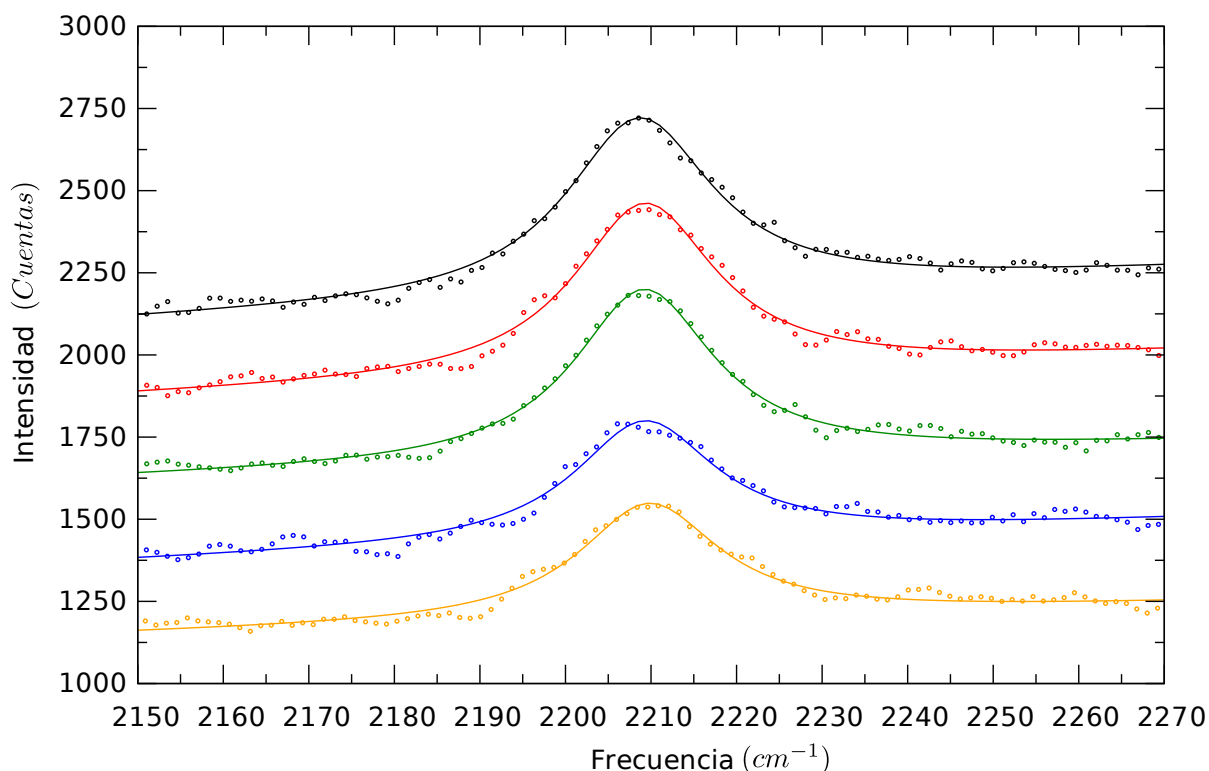


Figura III.4.6: Espectro Raman de la banda del estiramiento CN de la mesocianohemina IX adsorbida químicamente sobre un electrodo de plata a los potenciales -500 mV (negro), -375 mV (rojo), -250 mV (verde), -125 mV (azul) y 0 mV (naranja). Las líneas corresponden a la función ajustada y los puntos a los datos.

En estos gráficos de Intensidad (I) versus Frecuencia (ν) se ajustó la función de la ecuación III.4.6 a los datos de cada señal. La función se compone de una recta para la línea de base (parámetros m y b) sumada a una Lorentziana que tiene un parámetro de intensidad máxima (I_0), ancho (w) y frecuencia central (ν_c).

$$I = \frac{I_0 w^2}{(\nu - \nu_c)^2 + w^2} + m\nu + b \quad (\text{III.4.6})$$

Si bien la muestra de porfirina utilizada para la inmovilización contiene una mezcla de 3 isómeros, se espera que según las reglas de selección del SERRS se intensifiquen preferentemente aquellos modos (u orientaciones) que expongan una componente importante del tensor de polarizabilidad perpendicular a la superficie, o sea, que se amplificarán diferencialmente la señal de las porfirinas que posean el grupo CN perpendicular a la superficie [19, 20]. Además, según se espera a partir de los cálculos el corrimiento, sería importante en las porfirinas que tengan el grupo CN paralelo al campo, o sea, perpendicular a la superficie. En la Figura III.4.7 se grafican las frecuencias centrales de estos ajustes a cada potencial aplicado (E). Se ajustaron los datos a una función lineal (ecuación III.4.7) de la cual se obtuvo una pendiente de $a_1 = 2.0725 \cdot 10^{-3} \text{ cm}^{-1} \text{ mV}^{-1}$ y una ordenada al origen de $a_0 = 2209.77 \text{ cm}^{-1}$ (coeficiente de correlación: 0.975).

$$\nu = a_0 + a_1 E \quad (\text{III.4.7})$$

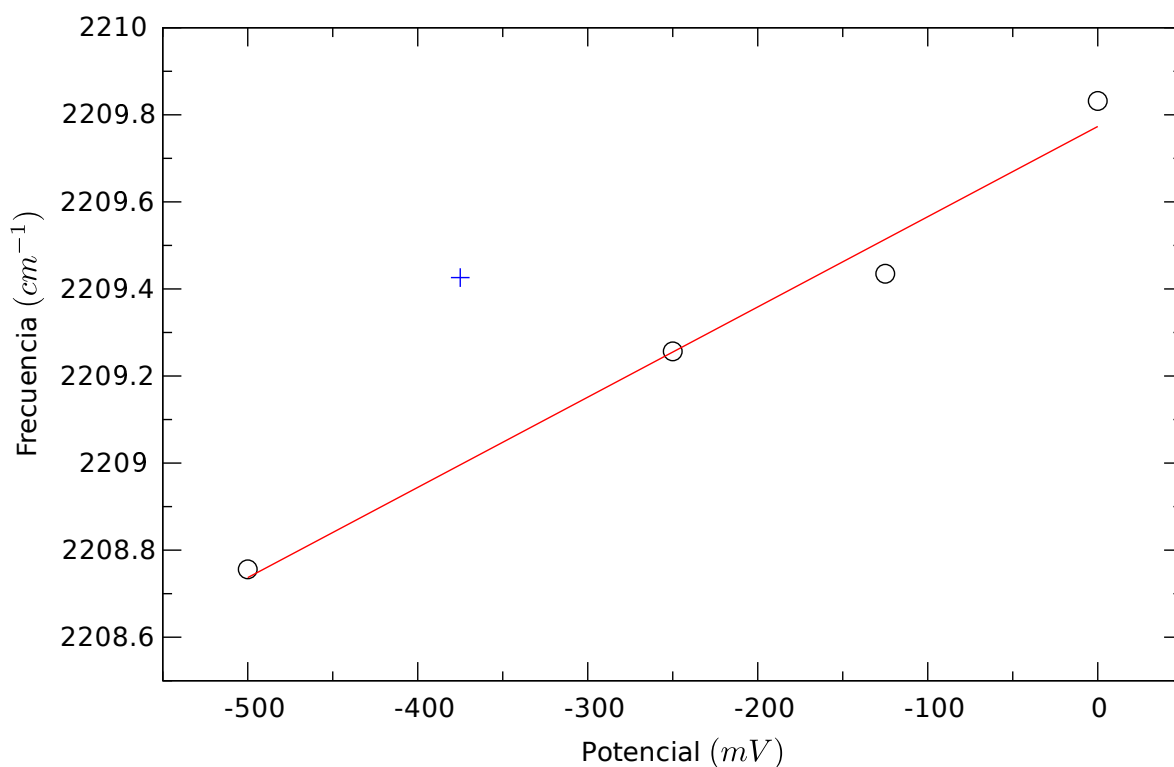


Figura III.4.7: Corrimiento de la frecuencia de la banda de 2209 cm^{-1} con el potencial aplicado (E). La línea roja corresponde a la regresión lineal de los datos. Los círculos corresponden a las ν_c obtenidas a cada potencial. La cruz corresponde al dato de -375 mV que no fue considerado en la regresión lineal.

III.4.4.3. Estimación del campo eléctrico

Si se quiere correlacionar ahora el potencial aplicado con el campo eléctrico se necesita combinar la ecuación III.4.7 que relaciona la frecuencia medida experimentalmente con el potencial aplicado y la ecuación III.4.8 que relaciona la frecuencia con el campo, el STR (σ) y la frecuencia a campo cero (ν_0) en un régimen lineal cuando el valor absoluto del campo es menor a 0.1 V.Å^{-1} . La ecuación resultante de esta combinación se muestra en III.4.9.

$$\nu = \nu_0 + \sigma F \quad (\text{III.4.8})$$

$$F = \frac{a_0 - \nu_0}{\sigma} + \frac{a_1}{\sigma} E \quad (\text{III.4.9})$$

Sería incorrecto utilizar ν_0 de los cálculos ya que la frecuencia absoluta de los cálculos difiere de los valores experimentales y además no se determinaron para esta misma porfirina. Sin embargo, con esta ecuación se puede obtener diferencias de campos respecto de dos potenciales distintos ($F_2 - F_1 = \frac{a_1}{\sigma} (E_2 - E_1)$). Aún así, si se supone que el potencial de carga cero (E_z) medido para los electrodos rugosos modificados con *ZnMes* en el capítulo anterior es similar a estos electrodos podemos extrapolar con la ecuación que relaciona la frecuencia con el potencial y el E_z , la frecuencia cuando el campo eléctrico es cero (ecuación III.4.10).

$$\nu_0 = a_0 + a_1 E_z \quad (\text{III.4.10})$$

Una vez obtenido ν_0 se puede obtener el valor del campo absoluto para los distintos potenciales aplicados usando la ecuación III.4.9. En la Tabla III.4.3 se muestran los campos estimados a los potenciales aplicados en cada una de las mediciones.

Tabla III.4.3: Campos eléctricos estimados a distintos potenciales. Se utilizó para estimarlos el STR de la Fe(II)-mesocianoporfirina y los parámetros experimentales obtenidos del corrimiento de la frecuencia vibracional con el potencial.

Potencial (mV)	Campo Eléctrico (mV.Å ⁻¹)	Frecuencia (cm ⁻¹)
83.4	0.00	2209.95
0	-2.66	2209.77
-125	-6.65	2209.51
-250	-10.64	2209.26
-375	-14.62	2209.00
-500	-18.61	2208.74

III.4.5. Conclusiones

Los campos eléctricos obtenidos a partir de la teoría de la doble capa ($-72.7 \text{ mV.}\text{\AA}^{-1}$) y a partir del efecto Stark vibracional ($-18.6 \text{ mV.}\text{\AA}^{-1}$) son del mismo orden de magnitud para el mismo potencial (-500 mV). Sin embargo, se obtuvo un campo más débil con la estimación a partir del efecto Stark debido a que la monocapa formada por la mesocianohe-
mina IX unida a la cisteamina posee un ancho mucho mayor (20.4 \AA) que las monocapas de *ZnMes* utilizadas en el capítulo anterior (6.5 \AA), por lo que la capa compacta posee menor capacidad y el campo en su interior resulta ser más cercano a cero, lo cual es consistente con los datos obtenidos. Se ha verificado también con éxito la factibilidad de utilizar para tal fin el método de determinación del campo utilizando el efecto Stark vibracional. Queda pendiente la determinación del campo eléctrico con el modelo de la doble capa para el sistema de la cianohemina de forma de comparar los resultados arrojados por ambos métodos para un mismo sistema. Por otro lado, se ha encontrado que el grupo CN es una sonda Stark apropiada dado que mostró poseer un elevado coeficiente de variación Stark. Nuestros resultados indican que es posible obtener información de la orientación del campo ya que el efecto es especialmente intenso en la dirección paralela a la unión CN no siendo así en las direcciones perpendiculares. Esta porfirina ha mostrado ser de potencial aplicación para estimar la magnitud del campo eléctrico en el interior de una proteína.

III.4.6. Bibliografía

- [1] E. S. Park, S. S. Andrews, R. B. Hu, y S. G. Boxer. Vibrational Stark Spectroscopy in Proteins: A Probe and Calibration for Electrostatic Fields. *The Journal of Physical Chemistry B*, 103:9813–9817, 1999.
- [2] E. S. Park y S. G. Boxer. Origins of the Sensitivity of Molecular Vibrations to Electric Fields: Carbonyl and Nitrosyl Stretches in Model Compounds and Proteins. *The Journal of Physical Chemistry B*, 106:5800–5806, 2002.
- [3] E. S. Park, M. R. Thomas, y S. G. Boxer. Vibrational Stark Spectroscopy of NO Bound to Heme: Effects of Protein Electrostatic Fields on the NO Stretch Frequency. *Journal of the American Chemical Society*, 122:12297–12303, 2000.
- [4] M. Laberge, K. A. Sharp, y J. M. Vanderkooi. Protein Electric Field Effects on the CO Stretch Frequency of Carbonmonoxycytochromes c as a Function of Carbonyl Tilting and Bending Investigated with a Continuum Electrostatic Approach. *The Journal of Physical Chemistry B*, 101:7364–7367, 1997.
- [5] M. Laberge, J. M. Vanderkooi, y K. A. Sharp. Effect of a Protein Electric Field on the CO Stretch Frequency. Finite Difference Poisson-Boltzmann Calculations on Carbonmonoxycytochromes c. *Journal of Physical Chemistry*, 100:10793–10801, 1996.
- [6] S. D. Dalosto, J. M. Vanderkooi, y K. A. Sharp. Vibrational stark effects on carbonyl, nitrile, and nitrosyl compounds including heme ligands, CO, CN, and NO, studied with density functional theory. *Journal of Physical Chemistry B*, 108:6450–6457, 2004.
- [7] A. C. de Dios y E. M. Earle. Electric field effects on ^{13}C and ^{17}O chemical shifts and CO stretching frequency of carbon monoxide bound to Fe^{2+} . *Journal of Physical Chemistry A*, 101:8132–8134, 1997.
- [8] J. R. Reimers y N. S. Hush. Vibrational Stark Spectroscopy 3. Accurate Benchmark ab Initio and Density Functional Calculations for CO and CN-. *The Journal of Physical Chemistry A*, 103:10580–10587, 1999.
- [9] A. Chattopadhyay y S. G. Boxer. Vibrational Stark Effect Spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society*, 117:1449–1450, 1995.
- [10] S. S. Andrews y S. G. Boxer. Vibrational Stark Effects of Nitriles I. Methods and Experimental Results. *The Journal of Physical Chemistry A*, 104:11853–11863, 2000.
- [11] J. P. Perdew, K. Burke, y M. Ernzerhof. *Physical Review Letters*, 77:3865, 1996.

- [12] J. P. Perdew, K. Burke, y M. Ernzerhof. *Physical Review Letters*, 78:1396, 1997.
- [13] A. D. Becke. *Physical Review A*, 38:3098, 1988.
- [14] A. D. Becke. *The Journal of Chemical Physics*, 98:5648, 1993.
- [15] A. D. Becke. *The Journal of Chemical Physics*, 98:1372, 1993.
- [16] M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, J. A. Montgomery, Jr., T. Vreven, K. N. Kudin, J. C. Burant, J. M. Millam, S. S. Iyengar, J. Tomasi, V. Barone, B. Mennucci, M. Cossi, G. Scalmani, N. Rega, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, M. Klene, X. Li, J. E. Knox, H. P. Hratchian, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, P. Y. Ayala, K. Morokuma, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, V. G. Zakrzewski, S. Dapprich, A. D. Daniels, M. C. Strain, O. Farkas, D. K. Malick, A. D. Rabuck, K. Raghavachari, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, Q. Cui, A. G. Baboul, S. Clifford, J. Cioslowski, B. B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R. L. Martin, D. J. Fox, T. Keith, M. A. Al-Laham, C. Y. Peng, A. Nanayakkara, M. Challacombe, P. M. W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M. W. Wong, C. Gonzalez, y J. A. Pople. *Gaussian 03*. Revision C.02, Gaussian, Inc., Wallingford, CT, 2004.
- [17] M. E. Jung y M. A. Lyster. *Journal of the American Chemical Society*, 99:968–969, 1977.
- [18] S. H. Brewer y S. Franzen. A quantitative theory and computational approach for the vibrational Stark effect. *Journal of Chemical Physics*, 119(2):851–858, 2003.
- [19] K. Kneipp, M. Moskovits, y H. Kneipp. *Surface-Enhanced Raman Scattering: Physics and Applications*. Eds. Springer, 2006.
- [20] E. C. Le Ru y P. G. Etchegoin. *Principles of Surface Enhanced Raman Spectroscopy and Related Plasmonics Effects*. Elsevier, 2008.

III.5

Efecto del campo eléctrico en la coordinación de ligandos en proteínas

III.5.1. Introducción

Muchas reacciones naturales involucran procesos de transferencia de carga que ocurren dentro o en las proximidades de las membranas biológicas. En este contexto y como consecuencia del potencial de membrana las proteínas que participan en estas reacciones están sometidas a la presencia de altos campos eléctricos que pueden alcanzar valores de hasta 100 mV.Å^{-1} [1]. Estos campos pueden tener un pronunciado efecto sobre la estructura y dinámica de las proteínas capaz de alterar sus funciones de una manera significativa. Un ejemplo especialmente relevante es el citocromo c (*cit-c*), una hemoproteína involucrada en la transferencia electrónica que juega un importante rol en una amplia variedad de procesos biológicos y aplicaciones tecnológicas [2]. El *cit-c* es una proteína soluble que se encuentra asociada a la membrana interna de la mitocondria donde cumple su función en la cadena respiratoria transportando electrones hacia a la proteína intermembranal citocromo c oxidasa [3]. El sitio activo del *cit-c* posee un hemina IX unida covalentemente por las cisteínas 14 y 17 a los vinilos del hemo con sus sitios de coordinación ocupados por la histidina 18 en el sitio proximal y la metionina 80 en el distal [4, 5]. El *cit-c* se une a las superficies negativas de la membrana plasmática y del dominio de unión en la subunidad II del citocromo c oxidasa a través de interacciones electrostáticas con una región del *cit-c* rica en lisinas cargadas positivamente [2, 6, 7]. El *cit-c* ha sido estudiado minuciosamente bajo diferentes condiciones. Aunque son particularmente relevantes los estudios del comportamiento del *cit-c* adsorbido sobre electrodos biomiméticos contruidos con monocapas autoensambladas que permiten la aplicación de campos eléctricos controlados [8, 9, 10, 11, 12, 13]. Resultados anteriores han mostrado que la inmovilización del *cit-c* en monocapas autoensambladas en electrodos de

plata puede producir, bajo ciertas condiciones, la descoordinación reversible de la metionina 80 (Met-80) de su sexto sitio de coordinación en el grupo hemo de la proteína [14]. La especie que carece de ligando Met-80 se denomina estado B2, en distinción al estado B1 en el cual la estructura nativa del *cit-c* está completamente preservada. Notablemente, el estado B2 tiene un potencial rédox que es unos 360 *mV* menor que en el estado nativo B1 [8]. Por medio del uso de monocapas autoensambladas con distinto largo de cadena y utilizando diferentes grupos funcionales la relación $\frac{[B2]}{[B1]}$ fue estimada en función del campo eléctrico aplicado [7]. Los resultados indican que a campos eléctricos bajos esta relación es menor que 0.1 y se incrementa a 0.7 cuando el campo se amplifica considerablemente [7]. Además, a potenciales menores que el potencial rédox de B1, sólo el estado reducido de B1 se observa, lo cual puede ser explicado debido a la estabilidad relativa de la unión Fe-Met que es mayor en el estado ferroso [15].

La dependencia con el campo de la transición al estado B2 que se observó se atribuye a la desestabilización del grupo prostético hémico que eventualmente conduce a la disociación de la Met-80 del hierro del hemo [8]. El campo eléctrico podría directamente afectar la energía de unión Fe-S actuando electrostáticamente sobre el sitio activo. Pese a que esto es esperable que ocurra, se calculó para sistemas modelo de hemos que la energía de disociación de la unión Met-Fe(III)(Hemo) no es muy sensible a campos eléctricos externos. Incluso a la intensidad extrema de campo de 100 *mV.Å*⁻¹, la energía de disociación de la unión es débilmente afectada (Tabla III.1.2) [15]. Otro posible escenario es que el campo eléctrico introduzca una fuerza sobre los residuos cargados y polares de la proteína que distorsione su estructura terciaria promoviendo la disociación de la unión.

El conocimiento de las bases estructurales de la transición inducida por el campo eléctrico en el *cit-c* es difícil de alcanzar a través de técnicas experimentales que sólo dan información estructural indirecta. Además, la magnitud del campo eléctrico es una variable difícil de conocer en ciertas condiciones experimentales. Sin embargo, las simulaciones de dinámica molecular (DM) proveen información dinámica y estructural con detalle atómico de sutiles transiciones conformacionales, y la aplicación de campos eléctricos uniformes es factible en esquemas típicos de DM.

En este apartado se presenta un estudio de dinámica molecular de la transición conformacional de disociación de la unión Fe-Met80 en el *cit-c*, y cómo el equilibrio y la cinética de este proceso es modulada por un campo eléctrico externo. Se obtienen resultados que permiten conducir a una explicación de cómo el campo eléctrico afecta esta transición en *cit-c*.

III.5.2. Métodos computacionales

III.5.2.1. Preparación del sistema

La estructura inicial del citocromo c de corazón de caballo (1HRC) fue obtenida de la base de datos de PDB [4], la misma corresponde al estado oxidado de la estructura del *cit-c* obtenida por cristalografía de rayos X. Los hidrógenos faltantes fueron agregados a la estructura de PDB. Se asignó a los residuos ionizables el estado de protonación estándar a pH fisiológico. La proteína en este estado tiene una carga neta de +8. Para preparar el sistema para las simulaciones de dinámica molecular la estructura de partida fue sumergida en una caja octaédrica truncada de 10 Å de moléculas de agua TIP3P. Se agregaron 8 aniones cloruro para neutralizar el sistema. El sistema final contiene la proteína, 5102 moléculas de agua y 8 aniones cloruro dando un total de 17059 átomos. Se introdujeron tres uniones adicionales entre la cadena de la proteína y el hemo, una entre el nitrógeno NE de la histidina 18 (HIS18NE) y el hierro hémico (N-Fe), dos entre cada grupo vinilo del hemo con el azufre de la cisteína 14 (Cis14) y 17 (Cis17) (C-S), para simular el tipo de hemo c. Finalmente para las simulaciones de B1 una unión adicional se introdujo entre el azufre de la metionina 80 (Met80S) y el hierro del hemo (HECFE).

III.5.2.2. Parámetros de la simulación de dinámica molecular

Todas las simulaciones se realizaron a 300 K y 1 bar mantenidos con el termostato y el barostato de Berendsen [16], usando condiciones periódicas de contorno y sumas de Ewald (espaciado de grilla de 1 Å) para el tratamiento de interacciones electrostáticas de largo alcance [17, 18]. El algoritmo de SHAKE [19] se usó para mantener las uniones que involucran átomos de hidrógeno en sus distancias de equilibrio. Se usó un salto temporal (Δt) de 2 fs para la integración de las ecuaciones de Newton. El radio de corte de las interacciones de no unión fue de 12 Å. Los parámetros del campo de fuerza de AMBER99 [20] se utilizaron para todos los residuos excepto para el hemo. Los parámetros para el hemo se desarrollaron y testearon minuciosamente en nuestro grupo en trabajos previos [21, 22]. Todas las simulaciones se realizaron con el módulo PMEMD del paquete de AMBER9 [23]. Se introdujeron algunas modificaciones al módulo PMEMD para incluir un campo eléctrico uniforme y uniones modeladas con el potencial de Morse como se describirá posteriormente.

Se aplicó un protocolo de equilibración que consiste en producir una minimización de energía para optimizar la estructura de partida, seguido de un calentamiento lento hasta la temperatura deseada utilizando una rampa lineal de temperatura comenzando desde 100 a 300 K durante 80 ps a volumen constante y luego una estabilización a 300 K a presión constante de 1 bar durante 100 ps. Se recolectaron imágenes de las posiciones a intervalos

de 2 ps que fueron usados para el análisis de las trayectorias. Se realizaron 4 simulaciones de DM de 50 ns:

1. *Sin* campo eléctrico *con* la unión Fe-Met80 (B1)
2. *Sin* campo eléctrico *sin* la unión Fe-Met80 (B2)
3. *Con* campo eléctrico *con* la unión Fe-Met80 (B1EF)
4. *Con* campo eléctrico *sin* la unión Fe-Met80 (B2EF)

III.5.2.3. Aplicación de un campo eléctrico homogéneo

La fuerza que produce un campo eléctrico sobre cada átomo está descrita por:

$$\vec{f}_i = q_i \vec{F} \quad (\text{III.5.1})$$

donde \vec{f} es el vector de la fuerza generada por el campo eléctrico sobre el átomo i , q es la carga parcial del átomo i y \vec{F} es el vector del campo eléctrico introducido externamente. La contribución a la energía producida por la acción del campo eléctrico en todos los átomos ξ se calculó como:

$$\xi = - \sum_{i=1}^n q_i \vec{F} \cdot \vec{r}_i \quad (\text{III.5.2})$$

donde \vec{r}_i es el vector posición del átomo i y n es el número total de átomos. Para las simulaciones con campo se aplicó una magnitud de campo de $25 \text{ mV.}\text{\AA}^{-1}$ la cual es 4 veces menor a la máxima fuerza de campo que se puede encontrar para una membrana modelo de fosfatidilcolina completamente saturada [1]. El vector de campo eléctrico se aplicó en la dirección paralela del dipolo total inicial de la estructura de la proteína.

III.5.2.4. Perfiles de energía libre de la transición de coordinación

Con el objeto de obtener información termodinámica del proceso de disociación la unión Fe-Met80, se obtuvieron perfiles de energía libre asociados al proceso en presencia y en ausencia del campo eléctrico. Los perfiles se construyeron realizando simulaciones de dinámica molecular dirigidas (MSMD) y utilizando la igualdad de Jarzynski [24], que relaciona valores de energía libre (ΔA) con trabajos irreversibles realizados sobre el sistema que procede a lo largo de la coordenada de reacción desde reactivos a productos de acuerdo con la ecuación III.5.3:

$$e^{-\frac{\Delta A(\xi)}{k_B T}} = \left\langle e^{-\frac{W(\xi)}{k_B T}} \right\rangle \quad (\text{III.5.3})$$

donde T es la temperatura, k_B es la constante de Boltzmann y $W(\xi)$ es el trabajo externo realizado sobre el sistema a medida que evoluciona desde el estado inicial hasta el final a lo largo de la coordenada de reacción ξ , calculado por integración de la fuerza que actúa sobre el potencial conductor a lo largo de ξ . El potencial conductor $E(\xi)$ es un potencial armónico que se mueve a una velocidad constante v lo largo de la coordenada de reacción (ecuación III.5.4).

$$E(\xi) = \frac{k}{2} [\xi - (\xi_0 + v\Delta t)]^2 \quad (\text{III.5.4})$$

En el presente estudio, la coordenada de reacción fue elegida como la distancia Fe(HEC)-S(Met80). En los cálculos realizados se utilizó una constante de fuerza k de $400 \text{ kcal.mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$ y una velocidad v de -3 \AA.ns^{-1} con y sin campo eléctrico. Se realizaron veinte simulaciones en las cuales se acercaba la unión Fe-S. Las estructuras de partida de cada simulación MSMD fueron tomadas al azar de las corridas de DM de B2 y B2EF. Dos perfiles de energía libre distintos se construyeron con y sin campo eléctrico de 25 mV.\AA^{-1} . Debido a que la transición de coordinación involucra la formación/ruptura de la unión Fe-Met80, un proceso no permitido dentro del campo de fuerzas estándar de DM, se introdujo un potencial de Morse que describe el potencial de unión (V) (ecuación III.5.5).

$$V = D [1 - e^{-a(r-r_e)}]^2 \quad (\text{III.5.5})$$

Los parámetros usados en este caso corresponden a la distancia de equilibrio r_e (2.362 \AA), la energía de disociación D ($13.84 \text{ kcal.mol}^{-1}$) y el ancho del potencial a (1.77 \AA^{-1}) el cual está relacionado con la constante de fuerza de la unión (k) como:

$$a = \sqrt{\frac{k}{2D}} \quad (\text{III.5.6})$$

Esta parametrización se realizó a través de cálculos de mecánica cuántica basados en DFT con el código SIESTA [25, 26] como se describe en la referencia 15 y en el capítulo III.1. El sistema modelo utilizado consistió de una porfirina de Fe(III), dimetiltiol y 5-metilimidazol como sistema modelo de hemo, metionina e histidina, respectivamente. El estado fundamental de espín se determinó calculando las energías de los estados de espín bajo, intermedio y alto. El parámetro D se calculó como la energía de disociación del dimetiltiol del hierro y el parámetro a se determinó ajustando el potencial de Morse a la energía de las estructuras obtenidas moviendo la distancia S-Fe cerca de la distancia de equilibrio.

III.5.2.5. Cálculo del momento dipolar eléctrico

En sistemas con carga neta distinta de cero, el momento dipolar calculado de la forma clásica depende del origen de las coordenadas. El momento dipolar eléctrico independiente del origen (\vec{p}) se calculó para un grupo de n átomos con carga parcial q_i y posiciones \vec{r}_i como:

$$\vec{p} = \sum_{i=1}^n (q_i - q_0) \vec{r}_i = \vec{d} - Q\vec{r}_0 \quad (\text{III.5.7})$$

donde $q_0 = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n q_i$, $\vec{d} = \sum_{i=1}^n q_i \vec{r}_i$ es el momento dipolar definido clásicamente, $Q = nq_0$ es la carga total del sistema de átomos y $\vec{r}_0 = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \vec{r}_i$ es el vector posición del centro geométrico del sistema. La sustracción de q_0 , el componente del monopolio, hace que el resultado sea independiente del origen escogido independientemente de la carga del sistema.

III.5.2.6. Contribución energética debido al campo eléctrico

La expresión para calcular la energía del sistema completo bajo la influencia del campo eléctrico uniforme aplicado se describe en la ecuación III.5.2. Como la proteína aislada es una partícula cargada, la energía del campo eléctrico depende de la posición de la proteína respecto al origen. Para que esta energía sea independiente de la posición se define ΔE_{CE} como:

$$\Delta E_{CE} = \xi + Q\vec{F} \cdot \vec{r}_0 = -\vec{F} \cdot \vec{p} \quad (\text{III.5.8})$$

donde todos los parámetros son los mismos de las ecuaciones III.5.2 y III.5.7. ΔE_{CE} es la energía del campo eléctrico menos el componente del potencial electrostático dado por el monopolio dentro del campo eléctrico constante.

III.5.2.7. Cálculo de parámetros termodinámicos

Se calcularon parámetros termodinámicos para todas las simulaciones usando la aproximación MM_PBSA implementada en el paquete de AMBER 9 el cual combina la energía de mecánica molecular con la aproximación de un solvente continuo. Las energías se determinan con el programa SANDER del paquete de AMBER. La energía total se obtiene a partir de la sumatoria de los terminos de energía interna (unión, ángulos y diedros), energía de las interacciones de van der Waals y energía de interacción electrostática. Se utiliza un radio de corte infinito para todas las interacciones. La contribución electrostática a la energía libre de solvatación se calcula a través de una resolución numérica del método de Poisson-Boltzmann (PB) implementado en SANDER. Los cálculos se realizaron para todas las simulaciones de

DM.

Los cálculos de la entropía conformacional se obtuvieron de la diagonalización de la matriz de covarianza pesada por las masas con los métodos de Schlitter [27], y Andricioaei y Karplus [28]. Como el muestreo en las simulaciones de dinámica molecular depende de la duración de la simulación, la entropía también depende de la longitud de la trayectoria utilizada para calcularla. Para obtener un valor que no dependa del largo de la trayectoria se calculó la entropía en intervalos crecientes de 2.4 ns, y se ajustaron los valores de entropía a la siguiente expresión:

$$S(t) = S_{\infty} - \frac{\alpha}{(t - t_0)^{\frac{2}{3}}} \quad (\text{III.5.9})$$

donde S_{∞} corresponde a la entropía a tiempo infinito y α y t_0 son parámetros independientes. Este procedimiento fue descrito previamente por Harris et al. [29]. Para los cálculos, se consideraron sólo los átomos de la cadena de los residuos 3 al 102.

III.5.3. Resultados

III.5.3.1. Estructura y dinámica de los estados coordinados

El análisis se comenzó comparando la estructura y la dinámica del estado B1 del *cit-c* (proteína nativa) en la ausencia (B1) y presencia (B1EF) de un campo eléctrico homogéneo de $25 \text{ mV.}\text{\AA}^{-1}$. Para cada estado, se realizó una simulación de DM de 50 ns partiendo de la estructura cristalográfica correspondiente al estado oxidado B1 del *cit-c*. La Figura III.5.1 muestra el RMSd (la raíz cuadrada de la distancia media cuadrática) de los átomos de la cadena en función del tiempo utilizando la estructura cristalográfica como referencia en ambas simulaciones.

Como es esperado en ausencia del campo eléctrico el estado B1 permanece cercano a la estructura cristalográfica de partida durante el tiempo de la simulación con un valor de RMSd de alrededor de 2.2 \AA (línea negra en la Figura III.5.1 y Tabla III.5.1). Sólo en dos ocasiones a lo largo de la simulación (a alrededor de 24 ns y al final de la simulación) el RMSd aumenta hasta 2.4 \AA debido a sutiles movimientos de algunos *loops*. Consecuentemente, el RMSd entre la estructura promedio de B1 y la estructura cristalográfica es 2.04 \AA .

Ante la aplicación de un campo eléctrico, la estructura del estado B1 es significativamente distorsionada resultando en un incremento de los valores de RMSd con respecto a la estructura cristalográfica en 15 % (Figura III.5.1 y Tabla III.5.1). Con el fin de analizar la estabilidad de la simulación se determinó el RMSd en función del tiempo (calculado para los últimos 46 ns) usando como referencia a la estructura promedio para el estado B1 y B1EF.

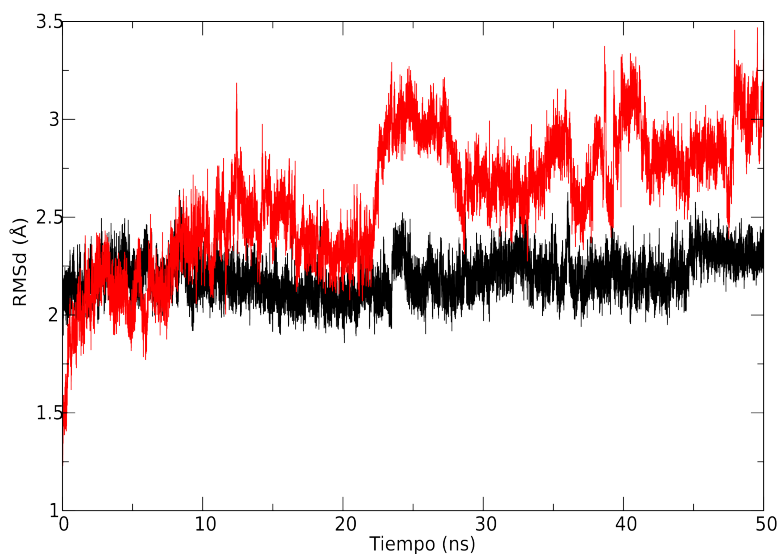


Figura III.5.1: RMSd de los átomos de la cadena en función del tiempo para B1 (línea negra) y B1EF (línea roja) con respecto a la estructura cristalográfica.

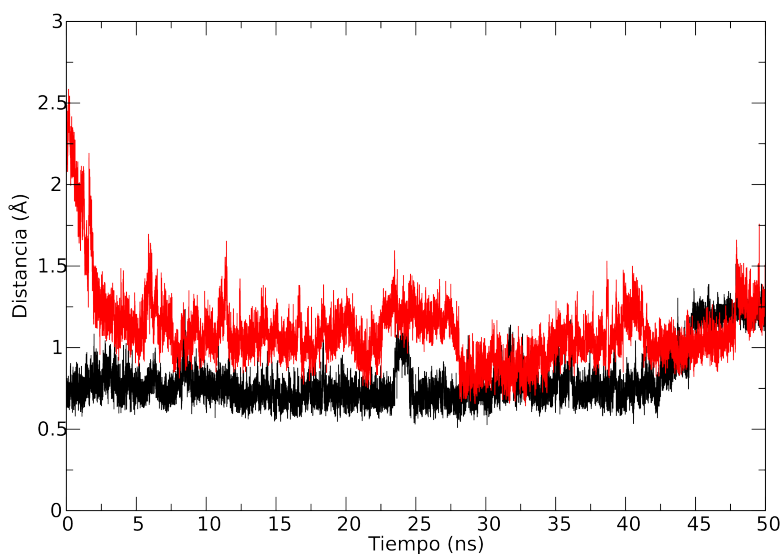


Figura III.5.2: RMSd de los átomos de la cadena respecto al tiempo para B1 (línea negra) y B1EF (línea roja) con respecto a la estructura promedio calculada.

Los resultados indican que ambos ensambles son estables a lo largo de la simulación (Tabla III.5.1 y Figura III.5.2). Otra información que se obtiene de los RMSd con respecto a la estructura promedio es la flexibilidad de la proteína ya que mientras mayor es este valor durante la dinámica, la proteína explora conformaciones más alejadas de la estructura promedio. Esto sugiere que el campo eléctrico aumenta la flexibilidad de la proteína.

Tabla III.5.1: (a) RMSd promedio calculado con respecto a la estructura de rayos X de partida donde los primeros 4 ns de simulación no fueron considerados, (b) RMSd entre la estructura cristalográfica y la estructura promedio, y (c) RMSd promedio calculado con respecto a la estructura promedio. Unidades en Å.

Estado	(a)	(b)	(c)
B1	2.197 ± 0.105	2.037	0.810 ± 0.173
B1EF	2.643 ± 0.292	2.354	1.069 ± 0.143
B2	2.222 ± 0.248	1.830	1.147 ± 0.172
B2EF	3.593 ± 0.322	3.190	1.485 ± 0.188

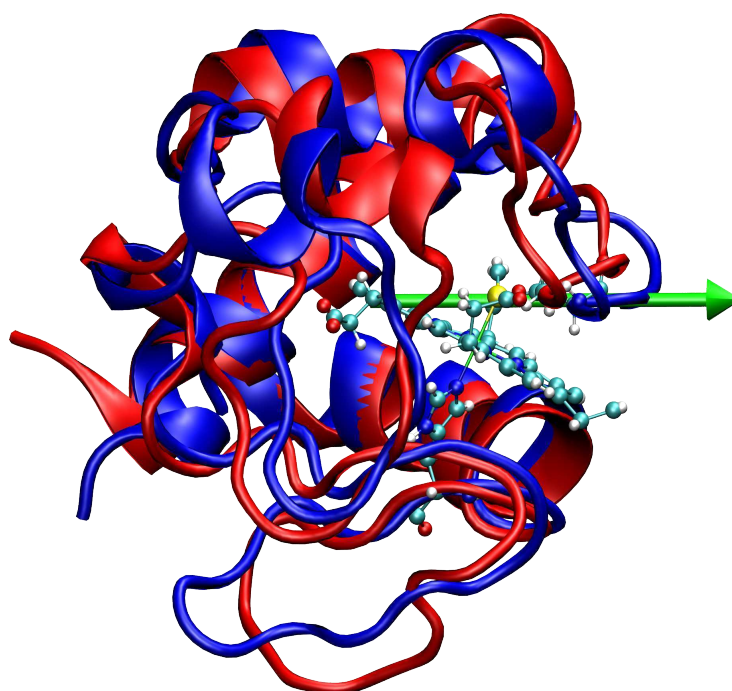


Figura III.5.3: Estructuras promedio de B1 (azul) y B1EF (rojo), y el vector del momento dipolar de B1 (flecha verde).

Las diferencias estructurales entre B1 y B1EF se resaltan en la Figura III.5.3 donde se superponen ambas estructuras promedio, y en la Figura III.5.4 donde se grafica la distancia entre los carbonos-alfa ($C\alpha$) de ambas estructuras promedio en función del número de residuo.

Para caracterizar el efecto del campo eléctrico en la dinámica de la proteína, en principio, se calculó la raíz cuadrada del promedio cuadrático de las fluctuaciones (RMSf) con respecto a la estructura promedio de cada residuo considerando sólo los átomos del esqueleto (C, N, CA, O) para los estados B1 y B1EF, estos representan el desplazamiento promedio de los átomos de las cadenas representados en función de cada residuo, los resultados se muestran

en la Figura III.5.5.

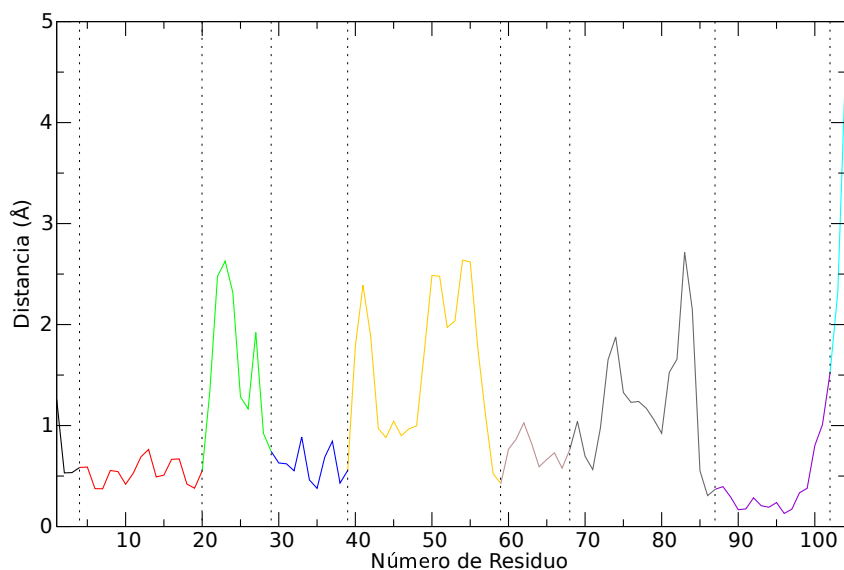


Figura III.5.4: Distancias entre los carbonos-alfa de las estructuras promedio de B1 y B1EF en función del número de residuo.

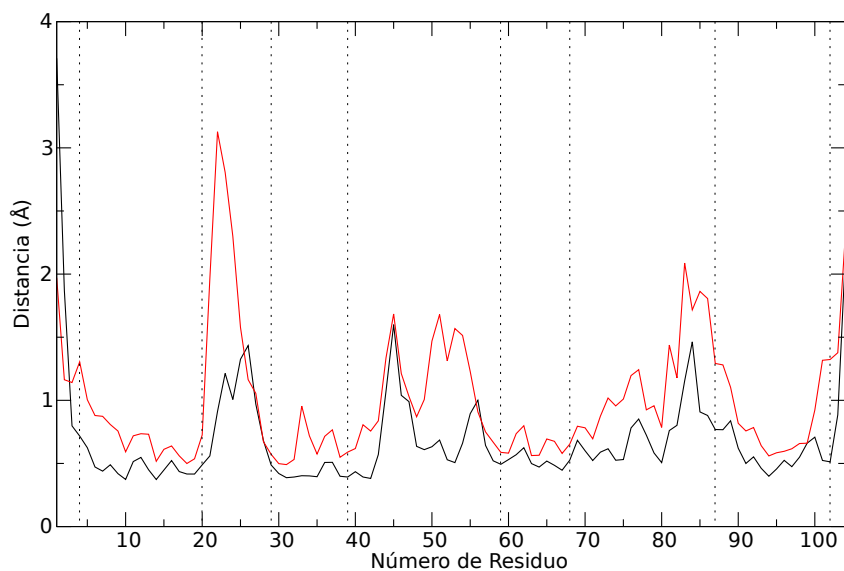


Figura III.5.5: Raíz cuadrada del promedio cuadrático de las fluctuaciones (RMSf) respecto de la posición promedio de los átomos de la cadena (CA, C, N, O) para dinámica de los estados B1 (en negro) y B1EF (en rojo) representados en función del número de residuos.

Los datos también muestran que el campo eléctrico incrementa la movilidad de la proteína y especifica cuales son los residuos más afectados. El incremento se distribuye a lo largo de

toda la proteína. Esto sugiere que el campo eléctrico desestabiliza la estructura de la proteína en forma globalizada.

En la Tabla III.5.2 se describen los elementos de la estructura cristalográfica del *cit-c*. Luego de una inspección cuidadosa de todas las simulaciones de DM, y con el fin de realizar un análisis estructural de la proteína, se agruparon elementos de la estructura secundaria contiguos en segmentos de mayor tamaño denominados *Segmentos Flexibilidad* (SF) clasificados en dos grupos: los segmentos *flexibles* (F) y *rígidos* (R). Esta clasificación se utilizará para todos los estados de la proteína.

Tabla III.5.2: Descripción de los elementos de la estructura secundaria de la estructura cristalográfica del *cit-c*. Los segmentos flexibilidad (SF) son elementos de la estructura secundaria agrupados y clasificados como segmentos flexibles (F) o rígidos (R). Rótulos de los elementos de la estructura secundaria ordenados por cantidad de interacciones internas creciente: *Coil* o *Loop* (C) = Giro, *Hydrogen bonded Turn* (T) = Giro unido por puente de hidrógeno, *Sheet* (S) = Hoja plegada, *Helix* (H) = Hélice.

Residuos	Rótulo	SF	Carga
1-4	CAT (Aminoterminal)	F1	-1
5-14	H1		
15-18	T1	R1	4
19-20	C1		
21-24	T2		
25	C2	F2	2
26-29	T3		
30-31	C3		
32-37	T4	R2	2
38-39	E1		
40-46	T5		
47-49	C4		
50-54	H2	F3	1
55-57	C5		
58-59	E2		
60	C6	R3	-2
61-68	H3		
69-78	T6	F4	4
79-87	C7		
88-102	H4	R4	1
103-104	CCT (Carboxiterminal)	F5	-2
105	Hemo	-	-1

Utilizando la Tabla III.5.2 como referencia, se puede observar en la Figura III.5.4 que ambas hélices terminales H1 y H4 permanecen sin ser perturbadas. Se observan cambios me-

nores para la hélice H3 también conocida como la hélice 60s. Todas estas hélices corresponden a los *segmentos rígidos*. Los mayores cambios estructurales se observan para los *segmentos flexibles* (Tabla III.5.2). Los segmentos rígidos están compuestos principalmente por estructuras secundarias estables como hélices largas (más de 7 residuos) y giros unidos por puente de hidrógeno largos (más de 5 residuos). Los segmentos flexibles están compuestos por giros (Loops/Coils), y demás elementos de corto tamaño. En resumen, la Figura III.5.4 muestra que el campo eléctrico induce cambios globales estructurales en el estado B1 del *cit-c* localizados especialmente en los segmentos flexibles. Como es de esperar, al comparar las Figuras III.5.4 y III.5.5 puede observarse que las regiones de mayor movilidad son aquellas que presentan cambios estructurales debidos al efecto del campo eléctrico (los segmentos flexibles). Sin embargo, no parece haber una correlación clara entre las magnitudes de las fluctuaciones (Figura III.5.5) y los cambios conformacionales inducidos por el campo eléctrico (Figura III.5.4).

III.5.3.2. Estructura y dinámica de los estados disociados

Luego de la remoción de la unión Fe(Hemo)-S(Met80) del campo de fuerza, se realizaron simulaciones de DM de 50 ns en ausencia (B2) y presencia (B2EF) de un campo eléctrico. En estas simulaciones los átomos de Fe(Hemo) y S(Met80) interactúan sólo a través de interacciones de no-unión y no están restringidos con potenciales armónicos a permanecer unidos. El panel superior de la Figura III.5.6 muestra la distancia Fe-S en función del tiempo para las simulaciones de B2 y B2EF. En ausencia del campo eléctrico (B2), el átomo de azufre de la metionina no unido permanece cerca del átomo de hierro a una distancia de 3 Å por 10 ns y luego, por el resto de la simulación, la distancia fluctúa libremente en abruptos saltos entre 3.5 y 5 Å. Este movimiento es ocasionado por la rotación del ángulo diedro CA-CB-CG-SD del residuo Met80 que aleja al átomo de azufre hasta casi 5 Å del átomo de hierro (Figura III.5.7). Pese a que la unión Fe-S está ausente, la proteína parece mantener a la metionina cerca del hierro probablemente a través de las interacciones de no-unión (electrostáticas y van der Waals) entre el hemo y la metionina 80, y a la rigidez de la estructura terciaria de la proteína. El resultado es completamente diferente en el estado B2EF. En este caso, el azufre de la Met80 se aleja inmediatamente del hierro entre 6 y 8 Å donde permanece por casi 20 ns. Luego, se vuelve a acercarse al hemo donde permanece por 15 ns a una distancia en promedio ligeramente mayor que para el estado B2. En el resto del tiempo de la simulación se aleja de nuevo.

En resumen, durante la escala de tiempo de la simulación, la Met80 resultó estar significativamente más cerca del hemo en el estado B2 en comparación con el estado B2EF como puede verse en el panel inferior de la Figura III.5.6 donde se grafica la densidad de población

de la distancia S-Fe durante la simulación para el estado B2 y B2EF. Como consecuencia de los cambios inducidos por el campo eléctrico en la estructura proteica, el ligando metionina se mantuvo lejos del hemo. Los dos picos que se observan para el estado B2 en el panel inferior de la Figura III.5.6 corresponden a los dos estados dados por la rotación del ángulo diedro mencionado.

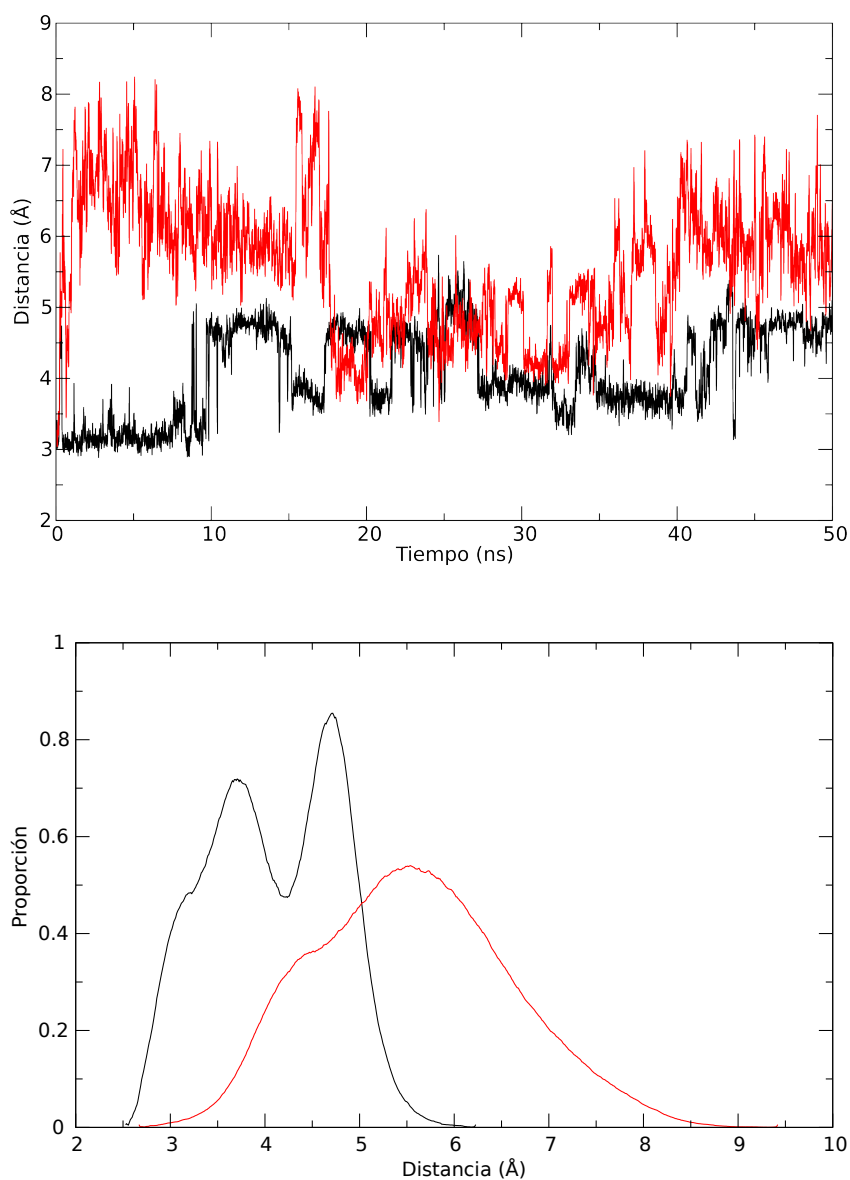


Figura III.5.6: Panel superior: Distancia S(Met80)-Fe(Hemo) en función del tiempo para B2 (en negro) y B2EF (en rojo). Panel inferior: densidad de población de la distancia S-Fe a lo largo de los 50 ns de simulación del estado B2 (negro) y B2EF (rojo) (en unidades arbitrarias).

En la Figura III.5.8 se grafican los RMSd en función del tiempo para las estructuras

B2 y B2EF utilizando la estructura cristalográfica como referencia. Consistentemente con los resultados anteriores de la distancia Fe-S, se observó que el campo eléctrico modifica la estructura del *cit-c* en el estado B2 más significativamente que en el estado B1. Resulta interesante notar que el efecto del campo eléctrico afecta más la estructura que la ausencia de la unión Fe-S (Comparar línea roja de Figura III.5.1 con línea negra de la Figura III.5.8 y la Tabla III.5.1).

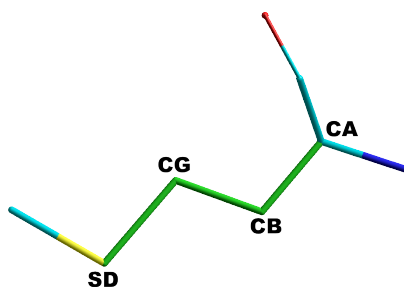


Figura III.5.7: Metionina 80. En verde, ángulo diedro CA-CB-CG-SD.

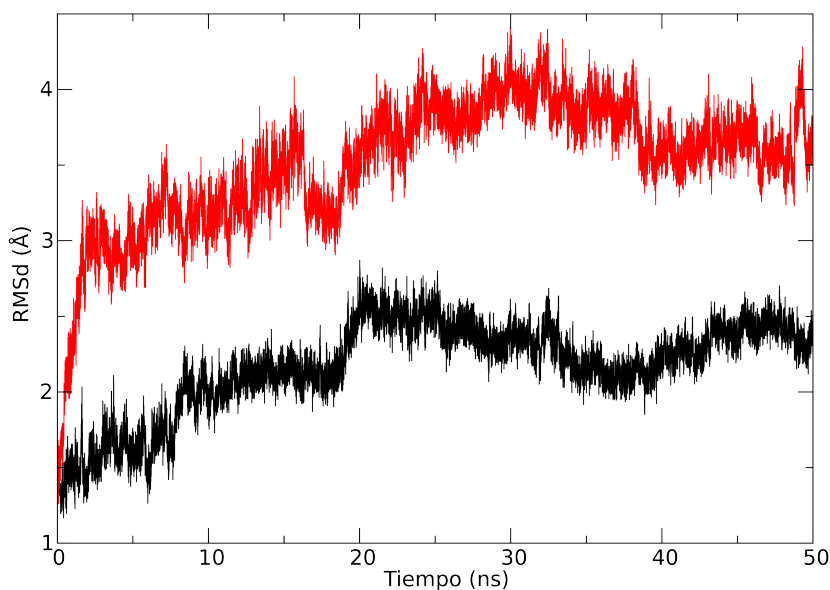


Figura III.5.8: RMSd con respecto a la estructura cristalográfica en función del tiempo para los estados B2 (negro) y B2EF (rojo).

La Figura III.5.9 indica que ambos ensambles (B2 y B2EF) son estables a lo largo de la simulación. Además para B2, el campo eléctrico aumentó la flexibilidad de la proteína como en el caso de B1. La Tabla III.5.1 (columna c) resume que B1 resultó ser poco flexible, B1EF y B2 mostraron flexibilidades similares y B2EF una mayor flexibilidad. O sea que la pérdida de la unión Fe-S que daría lugar al traspaso del estado B1 a B2 y B1EF a B2EF

estaría asociado a un aumento de la movilidad de la proteína. Esto también se observó como consecuencia de la aplicación de un campo eléctrico: como puede verse comparando las transiciones B1 a B1EF y B2 a B2EF, la movilidad también aumentó.

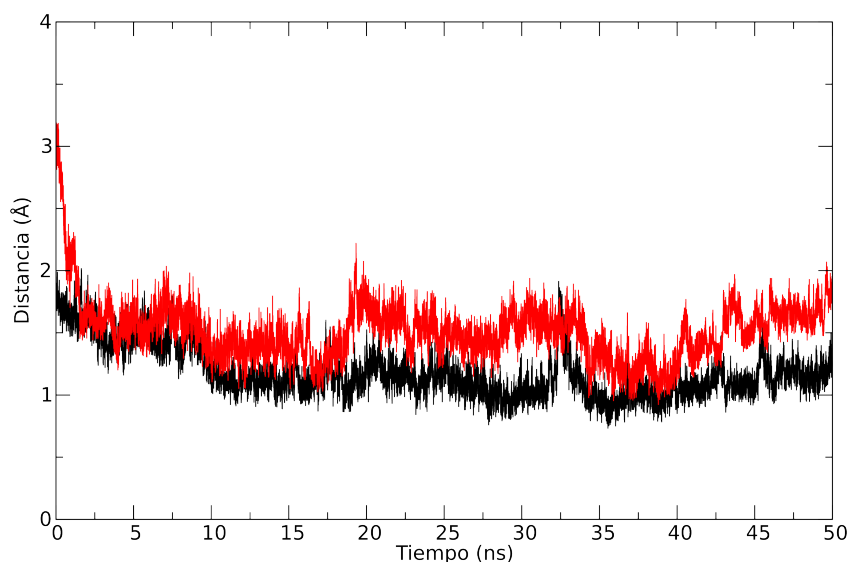


Figura III.5.9: RMSd con respecto a la estructura promedio en función del tiempo para los estados B2 (negro) y B2EF (rojo).

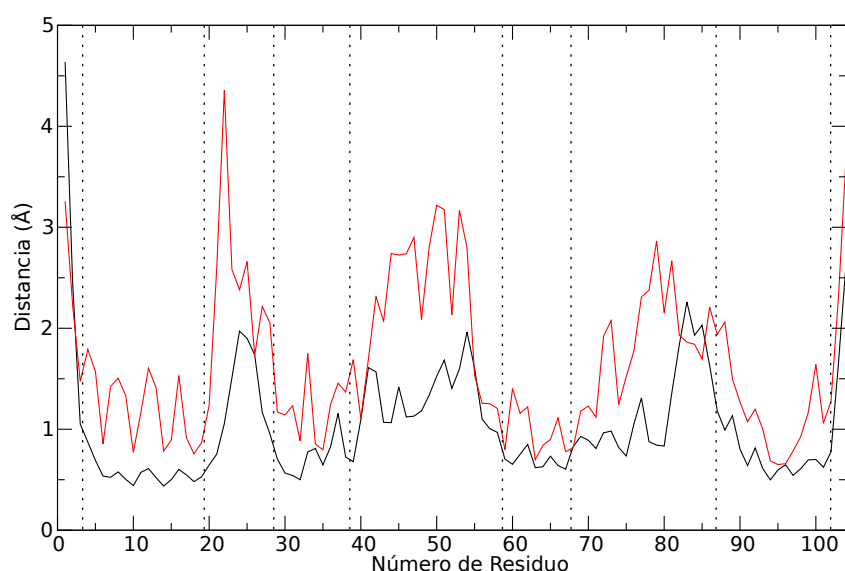


Figura III.5.10: Raíz cuadrada del promedio cuadrático de las fluctuaciones (RMSf) respecto de la posición promedio de los átomos de la cadena (CA, C, N, O) para las dinámicas de los estados B2 (en negro) y B2EF (en rojo) representados en función del número de residuo.

Los RMSf calculados para cada residuo en B2 y B2EF (Figura III.5.10) muestran la movilidad de los residuos durante la dinámica. De manera similar a lo que se observó para los estados B1, el campo eléctrico aumentó la movilidad de la proteína especialmente sobre los segmentos flexibles. Puede verse en este gráfico que la movilidad del estado B2 también resultó ser mayor que la del estado B1.

III.5.3.3. Estructura y dinámica de todos los estados

Las distancias de los carbonos- α entre las estructuras promedio de los estados B1 y B2 se calcularon en función del número de residuo (Figuras III.5.11 y III.5.12). Ambas estructuras promedio son representativas del ensamble conformacional como se muestra en el gráfico de RMSd vs. tiempo, usando la estructura de referencia (Figuras III.5.2 y III.5.9). Como puede verse en las Figuras III.5.11 y III.5.12, los mayores cambios entre el estado B1 y B2 están localizados en la hélice H2; cambios menores también se observan en C7 (Omega Loop) donde se encuentra Met80, C5 y T5. La Figura III.5.12 también muestra que la magnitud de los cambios es considerablemente menor que la observada debido al efecto del campo eléctrico en el estado B1 (Figura III.5.4).

Las distancias de los carbonos- α entre las estructuras promedio del estado B2 y B2EF se calcularon en función del número de residuo (Figura III.5.13). La estructura promedio de B2EF es también representativa del ensamble conformacional como se puede observar en la Figura III.5.9.

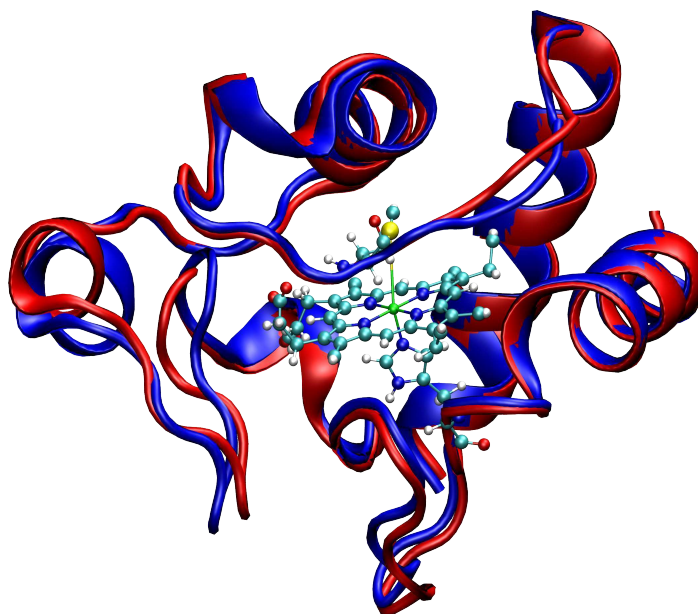


Figura III.5.11: Estructuras promedio de B1 (azul) y B2 (rojo).

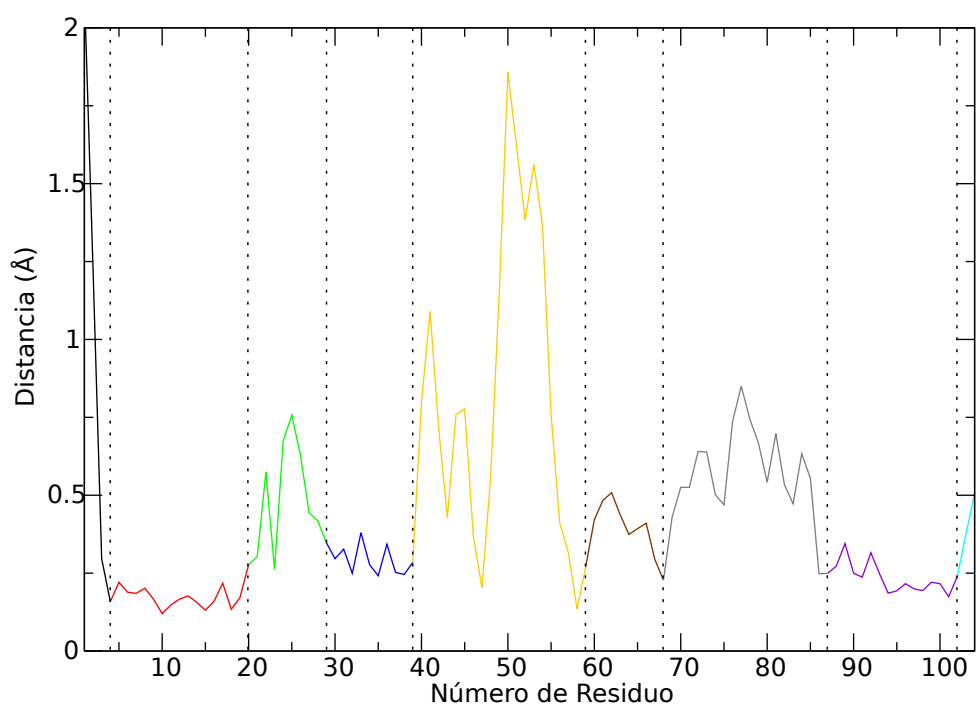


Figura III.5.12: Gráfico de distancia entre C_{α} vs. residuo para las estructuras promedio de B1 y B2.

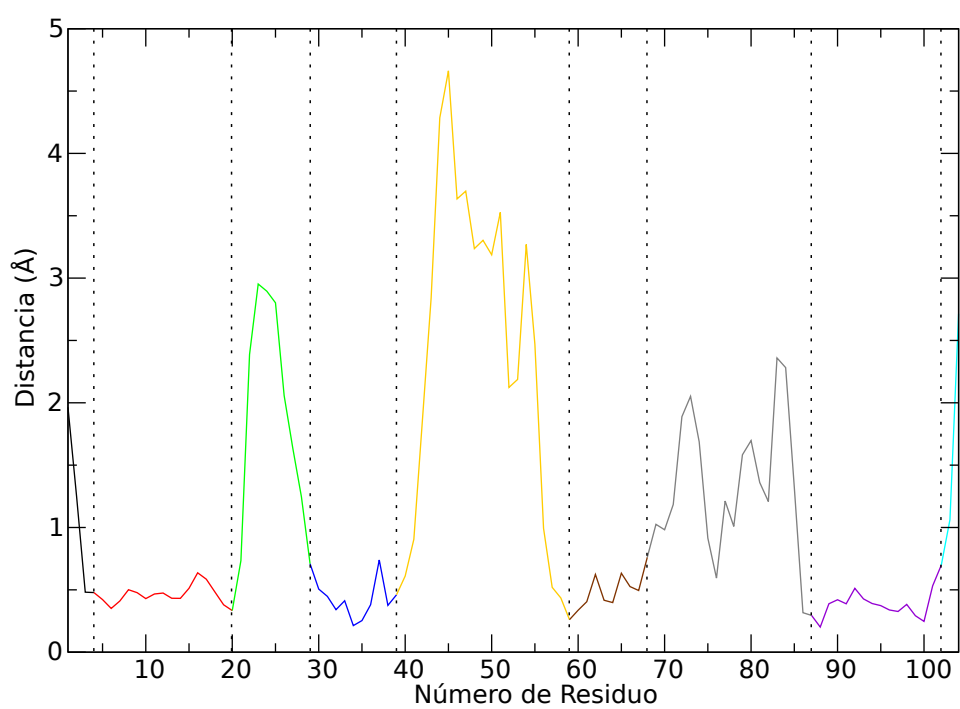


Figura III.5.13: Gráfico de distancia entre C_{α} vs. residuo para las estructuras promedio de B2 y B2EF.

Los resultados de la Figura III.5.13 muestran nuevamente que el campo eléctrico produce cambios significativos en la estructura del *cit-c*. Los cambios inducidos por el campo en el estado B2 están localizados en los mismos elementos de la estructura secundaria del estado B1, los segmentos flexibles. El cambio en F3 es especialmente significativo dado que la estructura del elemento H2 se pierde por completo. Finalmente, se puede efectuar una comparación entre el estado B1EF y B2EF que corresponden al cambio conformacional producido por la remoción de la unión Fe-S bajo los efectos del campo eléctrico. La Figura III.5.14 muestra la distancia vs. los residuos entre estas estructuras. Como ocurre en ausencia de campo, los cambios entre B1EF y B2EF están localizados principalmente en F2, F3 y el Omega loop (C7), la región que rodea a la Met80.

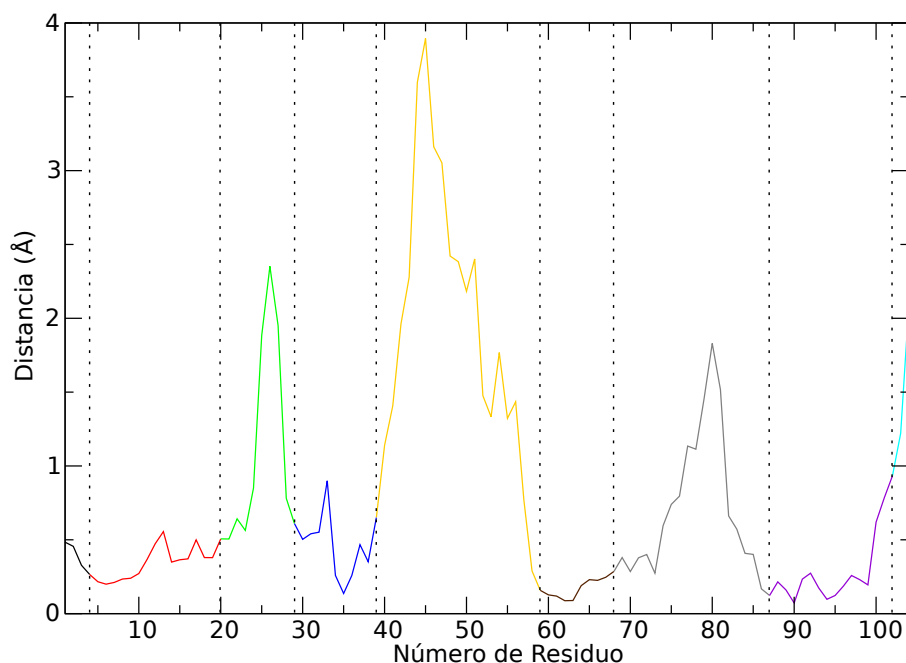


Figura III.5.14: Gráfico de distancia entre C_α vs. residuo para las estructuras promedio de B1EF y B2EF.

Tabla III.5.3: RMSd entre las cadenas de las estructuras promedio.

	B1	B2	B1EF	B2EF
B1	0	1.22	2.59	3.21
B2	1.22	0	2.25	3.16
B1EF	2.59	2.25	0	2.31
B2EF	3.21	3.16	2.31	0

Con el objeto de comparar la estructura entre los cuatro estados, se calculó el RMSd entre cada estructura promedio para el esqueleto de toda la proteína. Los resultados se

muestran en la Tabla III.5.3 en concordancia con los análisis anteriores. Está claro que las estructuras más cercanamente relacionadas corresponden a los estados B1 y B2. B1EF está estructuralmente a distancias similares de los estados B1, B2 y B2EF. B2EF es la estructura más divergente. En resumen, el campo eléctrico tiene un efecto significativo en la estructura y dinámica del *cit-c* e incrementa la movilidad global afectando a los segmentos flexibles.

III.5.3.3.1. Efecto del campo eléctrico en la estructura del citocromo c

Los resultados expuestos muestran que el campo eléctrico induce cambios significativos en la estructura y dinámica del *cit-c*. Para analizar cuáles elementos de la estructura del *cit-c* son responsables de los cambios estructurales se calculó el momento dipolar independiente del origen (\vec{p}) para los segmentos flexibilidad de la estructura del *cit-c* en cada estado. Para cada dipolo calculado adicionalmente se determinó el coseno del ángulo formado entre el vector del dipolo del segmento y el vector del dipolo total de la proteína completa ($\cos(\theta)$). En presencia del campo eléctrico, el vector del dipolo total de la proteína se alinea con el vector del campo eléctrico y por lo tanto el promedio temporal del valor del coseno entre ambos vectores es 0.988 ± 0.013 para B1EF y 0.990 ± 0.012 para B2EF. Los resultados se muestran en la Tabla III.5.4.

Tabla III.5.4: Valores promedio del módulo del momento dipolar independiente del origen ($|p|$) de los segmentos flexibilidad de los cuatro estados del *cit-c* (en Debye) y valores promedio del coseno del ángulo entre el dipolo total y el dipolo del segmento ($\cos(\theta)$).

	B1		B1EF		B2		B2EF	
	$ p $	$\cos(\theta)$	$ p $	$\cos(\theta)$	$ p $	$\cos(\theta)$	$ p $	$\cos(\theta)$
Total	132.1	1	425.4	1	147.1	1	451.1	1
F1	18.1	-0.18	17.9	0.57	31.0	-0.01	21.6	0.61
R1	103.6	-0.26	85.9	-0.10	101.8	-0.24	94.4	0.12
F2	19.1	-0.53	68.0	0.92	17.9	-0.37	72.2	0.89
R2	26.4	-0.11	35.8	0.24	29.0	0.09	34.7	-0.07
F3	26.2	0.25	34.4	0.76	22.0	0.44	55.5	0.74
R3	34.2	-0.45	30.6	0.11	35.1	-0.50	27.5	-0.23
F4	44.0	0.60	77.4	0.91	37.5	0.68	91.4	0.94
R4	55.2	-0.29	53.1	0.02	56.6	-0.13	50.3	0.07
F5	18.9	0.15	19.1	0.85	19.0	0.44	19.1	0.80

Todo dipolo ante la presencia de un campo eléctrico tiende a girar para alinearse con él, bajando su energía (ecuación III.5.8). Adicionalmente, el sistema tiene a polarizarse (cambiar su dipolo) por lo que si aumenta su dipolo estando alineado al campo su energía bajará aún más. La Tabla III.5.4 muestra que la presencia del campo introduce un aumento del dipolo total del *cit-c* en un factor de aproximadamente 3, lo que indica que la proteína se polariza

fuertemente. El efecto del campo eléctrico en los fragmentos que pueden rotar libremente debería consistir en alinear sus dipolos con el vector del campo y polarizarlos positivamente incrementando sus dipolos. Sin embargo, si el fragmento no puede rotar y está orientado en sentido contrario al campo, se polariza negativamente disminuyendo el módulo de su dipolo como sucede para R3 entre los estados B2/B2EF y R1 entre los estado B1/B1EF. Los datos de la Tabla III.5.4 también dejan ver que los más grandes cambios debidos a la presencia del campo ocurren en F2 (ver también Tabla III.5.5). En los estados B1 y B2, F2 muestra un dipolo pequeño alineado en la dirección opuesta del dipolo total de la proteína. Cuando se aplica el campo eléctrico la orientación y la magnitud del dipolo cambia completamente y se alinea con el campo. En términos generales, los segmentos rígidos no se polarizan notablemente con el campo pero sí se orientan a expensas de la deformación de los segmentos flexibles vecinos. Los segmentos flexibles están notablemente polarizados por el campo eléctrico (excepto por los segmentos terminales) y todos ellos se reorientan con el campo. Al multiplicar $|\vec{p}|$ por $\cos(\theta)$ se obtiene el componente del dipolo del segmento en la dirección del dipolo total (p_z). Al calcular la diferencias de p_z entre los estados con y sin campo eléctrico se obtienen los cambios en el componente del dipolo del segmento (Δp_z) que es un estimador de cuánto cambia la contribución del dipolo del segmento con el campo al dipolo total de la proteína (Tabla III.5.5). La Tabla III.5.5 muestra claramente que F2 y F4 son los principales segmentos cambiados que contribuyen al importante cambio del dipolo total dado por el campo eléctrico.

Tabla III.5.5: Cambio en el componente del dipolo del segmento (en la dirección del dipolo total) (Δp_z) cuando se aplica un campo eléctrico. Unidades en Debye.

	Δp_z	
	B1EF-B1	B2EF-B2
Total	293.3	304.0
F1	13.5	13.5
R1	18.3	35.8
F2	72.7	70.9
R2	11.5	-5.0
F3	19.6	31.4
R3	18.8	11.2
F4	44.0	60.4
R4	17.1	10.9
F5	13.4	6.9

Resulta interesante notar que el alineamiento y polarización de F4 (el que contiene a la Met80) es mayor cuando la unión Fe-S se remueve, lo que claramente sugiere que este segmento juega un rol clave en la estabilización del estado B2 y en el estiramiento de la

distancia Fe-S en la presencia del campo eléctrico. Otro factor que contribuye a este efecto es la carga de los segmentos (Tabla III.5.2). Se puede observar que la carga positiva de los segmentos contiguos F4 y R4 fuerzan a éstos a desplazarse en dirección del campo, mientras que los segmentos contiguos de sus extremos R3 y F5 tienen carga negativa y se mueven en dirección contraria junto con el Hemo (cuya carga también es negativa). Esto último produce la separación del Hemo de la Met80.

III.5.3.4. Efecto del campo eléctrico en la disociación

Para evaluar cuantitativamente los aspectos termodinámicos y cinéticos de la disociación Fe-S en presencia del campo eléctrico se calculó el perfil de energía libre para la transición en presencia y ausencia del campo eléctrico homogéneo usando MSMD que se describe en los métodos. Los perfiles resultantes se muestran en la Figura III.5.15.

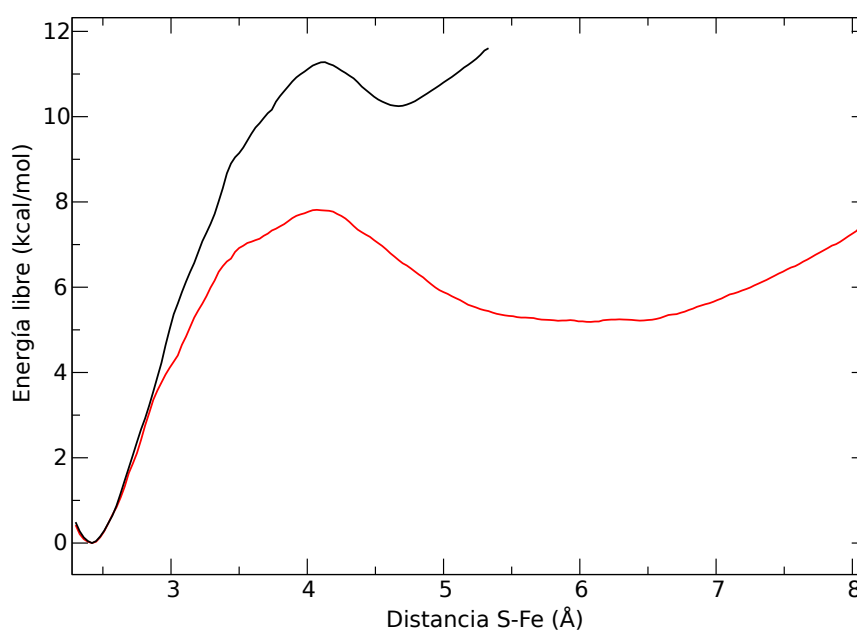


Figura III.5.15: Perfil de energía libre obtenida para la disociación Fe-S sin (negro) y con (rojo) campo eléctrico.

Los resultados de la Figura muestran claramente que el campo eléctrico desplaza el equilibrio hacia el estado B2EF. La presencia del campo reduce la barrera involucrada en la ruptura de la unión Fe-S de 11.3 a 7.8 $kcal.mol^{-1}$ (alrededor de 4 $kcal.mol^{-1}$) e incrementa la barrera necesaria para la formación de la unión Fe-S (1.6 a 2.6 $kcal.mol^{-1}$). Esto resulta en la estabilización dada por el campo del estado disociado en 5 $kcal.mol^{-1}$. Interesantemente, para ambas simulaciones y especialmente cuando se aplica el campo, la barrera para romper la unión Fe-S es menor en comparación con el valor de energía potencial fijado para la unión

($13.84 \text{ kcal.mol}^{-1}$). Otro efecto remarcable es que el estado disociado no es el mismo si el campo está presente o no. Esto se observa claramente en el perfil de la Figura III.5.15 que muestra que con el campo el mínimo del estado disociado se corre de 4.67 a 6.08 Å. El mínimo del estado disociado en presencia del campo (B2EF) también se caracteriza por ser bastante ancho (cerca de 2 Å) en comparación con el estado disociado sin campo (B2), lo que prueba que los estados B2 y B2EF son estados distintos. Esto también se puede inferir mediante la observación de las estructuras B2 y B2EF de la proteína (Figura III.5.16). Como consecuencia de la rotación del ángulo diedro CA-CB-CG-SD de la Met80 (Figura III.5.7) se obtiene el mínimo de B2. Sin embargo, el mínimo de B2EF se alcanza cuando la metionina 80 completa se aleja del hemo arrastrado por el esqueleto de la proteína debido a la interacción con el campo eléctrico (Figura III.5.16). Estos hechos sugieren fuertemente que el campo eléctrico cambia la estructura global de la proteína alejando la Met80 del Hemo.

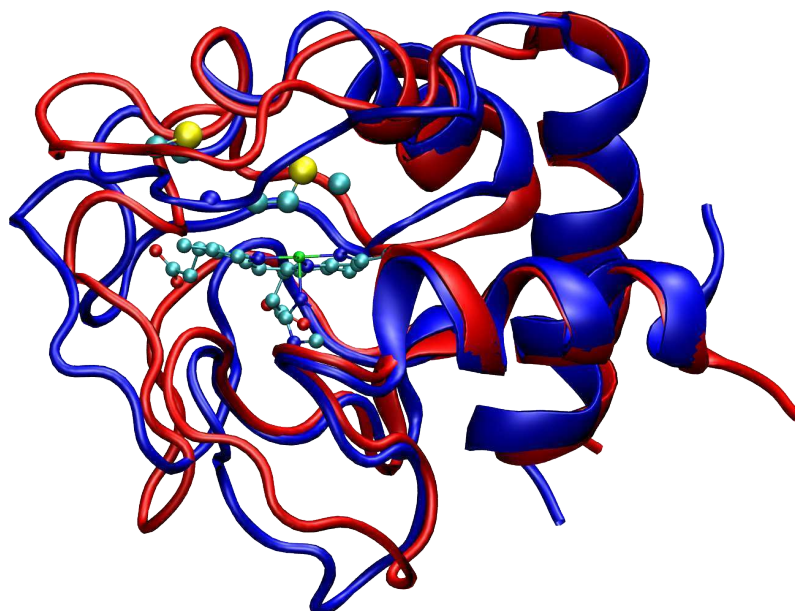


Figura III.5.16: Estructuras promedio de B2 (azul) y B2EF (rojo).

III.5.3.4.1. Análisis termodinámico

Se ha visto que el campo eléctrico desplaza el equilibrio de la reacción de disociación hacia el estado disociado, y además el análisis de la dinámica mostró que se incrementa la movilidad de la proteína. Con el objeto de analizar el efecto del campo eléctrico sobre esta reacción desde un punto de vista termodinámico, se determinó el cambio de varios parámetros termodinámicos en las simulaciones de equilibrio. Se calculó la diferencia de energía potencial de la proteína en fase gaseosa (ΔE_{gas}), la diferencia de energía libre de solvatación usando el método de PB (ΔG_{PB}) (ver métodos, no se tuvo en cuenta el efecto del campo eléctrico en

la polarización del solvente), $\Delta G_P = \Delta E_{gas} + \Delta G_{PB}$ que es una estimación del cambio de la energía libre sin la contribución del campo ni la de la entropía de la proteína, ΔE_{CE} la energía de la proteína dada por la alineación de su dipolo con el campo y $\Delta G_T = \Delta G_P + \Delta E_{CE}$ la energía libre sin considerar la entropía de la proteína. Independientemente se determinó la entropía de la proteína: S_K entropía calculada con el método de Karplus et al. y S_S entropía calculada con el método de Schlitter et al. (sección III.5.2.7). La entropía y el resto de las contribuciones energéticas no son combinables debido a que fueron calculadas utilizando distintas metodologías. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla III.5.6.

Tabla III.5.6: Cambios en parámetros termodinámicos para distintas transiciones del *cit-c*. Unidades en $kcal.mol^{-1}$. $T = 300K$.

Transición	ΔE_{gas}	ΔG_{PB}	ΔG_P	ΔE_{CE}	ΔG_T	$-T\Delta S_K$	$-T\Delta S_S$
$B1 \rightarrow B2$	66.3	-34.5	31.9	0	31.9	-46.7	-46.3
$B1EF \rightarrow B2EF$	58.9	-57.1	1.8	-5.6	-3.8	-43.9	-43.1
$B1 \rightarrow B1EF$	613.8	-537.7	76.1	-82.8	-6.7	-57.2	-55.1
$B2 \rightarrow B2EF$	606.4	-560.4	46.0	-88.4	-42.4	-54.4	-51.9
$B1 \rightarrow B2EF$	672.7	-594.9	77.9	-88.4	-10.5	-101.1	-98.2

La energía potencial de la transición B1 a B2 para la proteína aislada, en presencia y en ausencia del campo, está desfavorecida. Esto es consistente con la pérdida de interacciones nativas de la proteína dada por la disociación de la Met80. Las transiciones que involucran pasar de un estado sin campo a otro con campo son energéticamente aún más desfavorecidas debido a que el campo eléctrico introduce una deformación sobre la proteína que produce pérdidas más importantes de interacciones internas. Los efectos de solvatación compensan los efectos de desestabilización de interacciones electrostáticas como se observa en los ΔG_P . La energía dada por la orientación del dipolo total con el campo eléctrico produce una estabilización energética de los procesos involucrados en el pasaje de un estado sin campo a otro con campo sobre el resto (ΔG_T). Considerando todos los efectos energéticos (ΔG_T) puede verse que, la disociación está energéticamente más favorecida en presencia del campo que en ausencia del mismo y que la aplicación del campo al estado nativo B1 conduce a la proteína al traspaso espontáneo al estado B2EF. El cambio de entropía para la disociación es siempre positivo independientemente de la presencia del campo, lo que contribuye a la espontaneidad de este proceso. La ganancia de un número mayor de grados de libertad introducida por la pérdida de la unión Fe-S o por la interacción con el campo eléctrico, lo que produce pérdida de interacciones internas de la proteína, resulta en el aumento de flexibilidad/movilidad, la que está directamente asociada con el aumento de la entropía. Puede verse que el efecto del campo produce un aumento mayor de la entropía que la pérdida de la unión Fe-S. La transición B1 a B2EF combina ambos efectos, por eso conlleva el mayor

cambio de entropía.

Se concluye que la aplicación de un campo eléctrico sobre el estado nativo del *cit-c* (B1) favorece energéticamente y entrópicamente la pérdida de la unión Fe-S, o sea favorece al estado B2. La presencia del campo eléctrico y la pérdida de la unión Fe-S provocan la pérdida de interacciones nativas que conduce a la disminución de la energía de solvatación y al incremento de la entropía, hechos consistentes con un estado parcialmente desplegado de la proteína.

III.5.4. Discusión

III.5.4.1. ¿Cómo actúa el campo eléctrico en la transición de coordinación?

El cambio energético asociado a la reacción inducido por el campo eléctrico ($\Delta\Delta E^F$) depende principalmente del cambio en el momento dipolar permanente ($\Delta\mu^0$) y del cambio en la polarizabilidad ($\Delta\alpha$) de la reacción en dirección del vector del campo (z), y del modulo del campo eléctrico (F) como se representa en la ecuación III.5.10 (obtenida a partir de la ecuación III.1.4).

$$\Delta\Delta E^F \cong -\Delta\mu_z^0 F - \frac{1}{2}\Delta\alpha_z F^2 \quad (\text{III.5.10})$$

Mientras mayor sean los cambios del momento dipolar permanente y la polarizabilidad, mayor es el efecto del campo eléctrico sobre el sistema. El cambio en la polarizabilidad tiene una contribución electrónica y nuclear. La contribución electrónica es usualmente mayor que la nuclear para moléculas pequeñas. Este hecho se verifica al observar el incrementado momento dipolar inducido de estas moléculas en presencia de un campo eléctrico sin que se afecten significativamente las posiciones nucleares de sus átomos [15]. En las macromoléculas como las proteínas, los residuos cargados y la gran flexibilidad de su estructura hacen que la contribución nuclear resulte la más importante. Los datos que se presentan en este trabajo sugieren que debido a la gran polarizabilidad nuclear del *cit-c*, la magnitud del campo eléctrico requerida para promover una distorsión geométrica de su estructura proteica con efectos muy significativos es menor que la necesaria para sistemas moleculares más pequeños como porfirinas [15].

Teniendo en cuenta los resultados ya expuestos es posible dar una imagen completa de por qué sucede la transición de disociación inducida por el campo eléctrico. En condiciones normales el estado B1 es el estado más estable. La aplicación de un campo eléctrico produce un cambio en el balance entropía-energía que desplaza el equilibrio hacia el estado disociado

(B2EF). El análisis termodinámico muestra, como se espera, que los estados B2 y B2EF son más flexibles (entrópicamente favorecidos) que los estados respectivos B1 y B1EF. El campo eléctrico también incrementa la movilidad y la entropía de los estados coordinado y disociado desestabilizando la estructura global de la proteína manifestada por la pérdida de interacciones atractivas. El costo energético de desplegar parcialmente a la proteína es sobrecompensado por la energía ganada al alinear el incrementado dipolo de la proteína con el campo eléctrico externo.

III.5.4.2. Implicaciones fisiológicas

Se ha demostrado que el comportamiento del *cit-c* es afectado por un campo eléctrico de magnitud moderada. La velocidad y la factibilidad termodinámica de la transición de B1 a B2 es incrementada por el campo eléctrico. El estado disociado posee un potencial de reducción corrido negativamente con respecto al estado activo nativo [15, 8]. Esta transición podría estar modulada por el cambio en el potencial eléctrico de ambos lados de la membrana plasmática donde opera el *cit-c*. Esto puede cambiar el potencial y la velocidad de la transferencia electrónica de la proteína incrementando o disminuyendo los mismos de acuerdo a las necesidades de la célula.

Adicionalmente, el campo eléctrico presente en el *cit-c* cuando ocurre la formación del complejo *cit-c/cit-c oxidasa* puede conducir a que el estado oxidado más estable sea el B2 por lo que al ocurrir la transferencia electrónica la energía libre del proceso de oxidación del estado B1 reducido será menor ya que el estado final B2 oxidado tiene una energía libre menor que el B1 oxidado. El campo eléctrico produciría entonces un *switch* en el potencial rédox del *cit-c* promoviendo la transferencia electrónica a la *cit-c oxidasa*. Sin embargo, esto debería ser estudiado midiendo o calculando el campo eléctrico en el complejo y además estudiando el efecto del campo eléctrico en la transición del estado reducido B1 al B2 y en la transición de estos estados a los estados oxidados.

Podría concluirse que la estructura del citocromo c se encuentra naturalmente diseñada, a través de la localización estratégica de aminoácidos cargados y polares, para que la unión Fe-S sea especialmente sensible al campo eléctrico.

III.5.5. Conclusiones

Por medio del uso de simulaciones de dinámica molecular se ha estudiado la transición estructural B1-B2 en el citocromo c, caracterizada por la descoordinación de la Met80 del grupo hemo, en presencia y en ausencia de un campo eléctrico uniforme externo. Los resultados obtenidos muestran que el campo eléctrico produce cambios significativos en la

estructura y dinámica del *cit-c* en ambos estados. El campo eléctrico produce un incremento global de la movilidad de la proteína (incremento entrópico) que puede ser interpretado por un desplegado parcial de la proteína que favorece al estado B2. Este desplegado parcial es una consecuencia de la reorientación y polarización de varios segmentos de la proteína que se producen perdiendo interacciones internas. Esto genera una desestabilización de la energía interna que es sobrecompensada por la estabilización energética producida por el alineamiento del dipolo incrementado de la proteína con el campo. Las regiones que son más significativamente afectadas por el campo y por la pérdida de la unión Fe-S son los segmentos flexibles F2, F3 y F4.

En resumen, se ha probado que la disociación reversible observada experimentalmente en el citocromo c inmovilizado puede ser explicada por la presencia del campo eléctrico en la superficie de los electrodos. El campo eléctrico induce un desplazamiento del equilibrio hacia el estado B2 e incrementa la velocidad de este proceso. El campo eléctrico no actúa electrostáticamente al nivel del sitio activo sino modulando interacciones en el esqueleto de la proteína [15]. Esta especial sensibilidad al campo eléctrico de la unión Fe-S del *cit-c* puede estar relacionada con la función biológica que controla la transferencia electrónica.

III.5.6. Bibliografía

- [1] R. J. Clarke. The dipole potential of phospholipid membranes and methods for its detection. *Advances in Colloid and Interface Science*, 89:263–281, 2001.
- [2] J. Zhou, J. Zheng, y S. Jiang. Molecular simulation studies of the orientation and conformation of cytochrome c adsorbed on self-assembled monolayers. *Journal of Physical Chemistry B*, 108:17418–17424, 2004.
- [3] D. H. Murgida y P. Hildebrandt. Proton-Coupled Electron Transfer of Cytochrome c. *Journal of the American Chemical Society*, 123:4062–4068, 2001.
- [4] G. W. Bushnell, G. V. Louie, y G. D. Brayer. High-resolution three-dimensional structure of horse heart cytochrome c. *Journal of Molecular Biology*, 214:585, 1990.
- [5] A. M. Cassina, R. Hodara, J. M. Souza, L. Thomson, L. Castro, H. Ischiropoulos, B. A. Freeman, y R. Radi. Cytochrome c Nitration by Peroxynitrite. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(28):21409–21415, 2000.
- [6] S. Döpner, P. Hildebrandt, F. I. Rosell, A. Grant Mauk, M. von Walter, G. Buse, y T. Soulimane. The structural and functional role of lysine residues in the binding domain of cytochrome c in the electron transfer to cytochrome c oxidase. *European Journal of Biochemistry*, 261:379–391, 1999.
- [7] D. H. Murgida y P. Hildebrandt. Heterogeneous electron transfer of cytochrome c on coated silver electrodes. electric field effects on structure and redox potential. *Journal of Physical Chemistry B*, 105:1578–1586, 2001.
- [8] D. H. Murgida y P. Hildebrandt. Electron-transfer processes of cytochrome c at interfaces. new insights by surface-enhanced resonance raman spectroscopy. *Accounts of Chemical Research*, 37:854–861, 2004.
- [9] D. H. Murgida y P. Hildebrandt. Electrostatic-field dependent activation energies modulate electron transfer of cytochrome c. *Journal of Physical Chemistry B*, 106:12814–12819, 2002.
- [10] D. H. Murgida y P. Hildebrandt. Redox and redox-coupled processes of heme proteins and enzymes at electrochemical interfaces. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 7:3773–3784, 2005.
- [11] D. H. Murgida y P. Hildebrandt. Active-site structure and dynamics of cytochrome c immobilized on self-assembled monolayers-a time-resolved surface enhanced resonance

- raman spectroscopic study this work was supported by the deutsche forschungsgemeinschaft, the volkswagenstiftung, and the alexander-von-humboldt foundation. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 40:728–731, 2001.
- [12] L. Rivas, C. M. Soares, A. M. Baptista, J. Simaan, R. E. Di Paolo, D. H. Murgida, y P. Hildebrandt. Electric-field-induced redox potential shifts of tetraheme cytochromes c3 immobilized on self-assembled monolayers: Surface-enhanced resonance raman spectroscopy and simulation studies. *Biophysical Journal*, 88:4188–4199, 2005.
- [13] S. Todorovic, C. Jung, P. Hildebrandt, y D. H. Murgida. Conformational transitions and redox potential shifts of cytochrome p450 induced by immobilization. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 11:119–127, 2006.
- [14] H. Maity, J. N. Rumbley, y S. W. Englander. Functional role of a protein foldon—an omega-loop foldon controls the alkaline transition in ferricytochrome c. *Proteins*, 63:349–355, 2006.
- [15] P. M. De Biase, F. Doctorovich, D. H. Murgida, y D. A. Estrin. Electric field effects on the reactivity of heme model systems. *Chemical Physics Letters*, 434:121–126, 2007.
- [16] H. J. C. Berendsen, J. P. M. Postma, W. F. Van Gunsteren, A. DiNola, y J. R. Haak. *Journal of Chemical Physics*, 81:3684–3690, 1984.
- [17] T. Darden, D. York, y L. Pedersen. Particle mesh ewald—an nlog(n) method for ewald sums in large systems. *Journal of Chemical Physics*, 98:10089–10092, 1993.
- [18] U. Essmann, L. Perera, M. L. Berkowitz, T. Darden, H. Lee, y L. G. Pedersen. A smooth particle mesh ewald method. *Journal of Chemical Physics*, 103:8577–8593, 1995.
- [19] J. P. Ryckaert, G. Ciccotti, y H. J. C. Berendsen. Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: Molecular dynamics of n-alkanes. *Journal of Computational Physics*, 23:327–341, 1977.
- [20] T. E. I. I. Cheatham, P. Cieplak, y P. A. Kollman. A modified version of the cornell et al. force field with improved sugar pucker phases and helical repeat. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 16:845–862, 1999.
- [21] A. D. Nadra, M. A. Marti, A. Pesce, M. Bolognesi, y D. A. Estrin. Exploring the molecular basis of heme coordination in human neuroglobin. *Proteins*, 71:695–705, 2008.

-
- [22] L. L. Perissinotti, M. A. Marti, F. Doctorovich, F. J. Luque, y D. A. Estrin. A microscopic study of the deoxyhemoglobin-catalyzed generation of nitric oxide from nitrite anion. *Biochemistry*, 2008.
- [23] David A. Pearlman, David A. Case, James W. Caldwell, Wilson S. Ross, Thomas E. Cheatham III, Steve DeBolt, David Ferguson, George Seibel, y Peter Kollman. Amber, a package of computer programs for applying molecular mechanics, normal mode analysis, molecular dynamics and free energy calculations to simulate the structural and energetic properties of molecules. *Computer Physics Communications*, 91:1–41, 1995.
- [24] C. Jarzynski. Nonequilibrium equality for free energy differences. *Physical Review Letters*, 78:2690–2693, 1997.
- [25] J. M. Soler, E. Artacho, J. D. Gale, A. Garcia, J. Junquera, P. Ordejon, y D. Sanchez-Portal. The siesta method for ab initio order-n materials simulation. *Journal of Physics-Condensed Matter*, 14:2745–2779, 2002.
- [26] S. Reich, C. Thomsen, y P. Ordejon. Electronic band structure of isolated and bundled carbon nanotubes. *Physical Review B*, 65:155411, 2002.
- [27] J. Schlitter. Estimation of absolute and relative entropies of macromolecules using the covariance-matrix. *Chemical Physics Letters*, 215:617–621, 1993.
- [28] I. Andricioaei y M. Karplus. On the calculation of entropy from covariance matrices of the atomic fluctuations. *Journal of Chemical Physics*, 115:6289–6292, 2001.
- [29] S. A. Harris, E. Gavathiotis, M. S. Searle, M. Orozco, y C. A. Laughton. Cooperativity in drug-dna recognition: A molecular dynamics study. *Journal of the American Chemical Society*, 123:12658–12663, 2001.

IV

Conclusiones generales

IV.6

Conclusión final

El objetivo de este trabajo de tesis fue estudiar cómo afecta el campo eléctrico a las reacciones químicas. Se comprendió que el campo eléctrico puede afectar a varios niveles. Primero, afectando electrostáticamente a la reacción produciendo un corrimiento en el cambio de energía asociada. El campo produce un corrimiento negativo de la energía proporcional al campo y al cambio en el momento dipolar permanente asociado a la reacción. En segundo lugar, el campo perturba principalmente la estructura electrónica polarizando los reactivos y productos cambiando el momento dipolar del proceso y en consecuencia la energía del mismo. En algunos casos, como la reacción de coordinación de imidazol a porfirinas, el cambio energético es principalmente debido al cambio en el momento dipolar permanente asociado a la reacción. En otros casos, como la reacción de coordinación de oxígeno molecular a porfirinas, es debido al cambio en la polarizabilidad que ocurre durante la reacción. También ambos efectos pueden presentarse en simultáneo como en la coordinación de imidazol en porfirinas con oxígeno molecular coordinado.

Experimentalmente se obtuvo que el cambio en la energía libre asociado con la reacción de coordinación de un imidazol a una porfirina inmovilizada en electrodos de plata rugosa sigue una tendencia que se correlaciona con lo esperado según la teoría pese a que la magnitud del cambio obtenida difiere de la esperada. Es posible que estas diferencias se deban a que los campos eléctricos efectivos sean menores debido a que las porfirinas se encuentran predominantemente orientadas con el plano del anillo casi perpendicular a la superficie y no paralelo como se esperaba. Otra posibilidad es que la reacción que se haya estado midiendo sea la reacción de intercambio de ligandos agua-imidazol en lugar de la reacción de coordinación de imidazol, la cual posee un menor cambio en el momento dipolar permanente de la reacción, o sea, una menor dependencia con el campo. Por otra parte, se observó que el cambio de energía libre de esta misma reacción es menor en solución que en superficie. Según lo que los cálculos computacionales realizados sugieren, las magnitudes de estas diferencias

podrían deberse principalmente a la diferencia en la energía libre de solvatación dado que la reacción en superficie se efectuó en agua y la otra en cloroformo. También podría deberse a que se estén midiendo dos reacciones diferentes dado que en solución acuosa se espera que la porfirina tenga un agua coordinada al metal y en cloroformo no.

En sistemas macromoleculares como es el caso de una proteína, el efecto del campo eléctrico es notablemente más complejo, como hemos visto en el capítulo III.5. Se encontró que, en el citocromo c, la energía libre de coordinación de metionina a su grupo hemo es especialmente sensible al campo eléctrico pese a que la especie del sitio activo no es afectada electrostáticamente en forma significativa por el campo. Se encontró que el principal efecto radica en la fuerza que realiza el campo eléctrico sobre la estructura global de la proteína disminuyendo el cambio de energía libre del proceso de disociación del ligando actuando simultáneamente a nivel energético y entrópico. En este caso, el campo eléctrico afecta electrostáticamente a la reacción actuando sobre el esqueleto de la proteína y no sobre su sitio activo. Esta especial sensibilidad al campo eléctrico de la unión Fe-S del citocromo c puede estar relacionada con la función biológica de control de la transferencia electrónica dado que el potencial rédox de la proteína depende del estado de coordinación. El campo eléctrico en un sistema relativamente flexible como una proteína actúa polarizando al sistema a través de la perturbación de la posición de los núcleos incrementando su momento dipolar y así intensificando el efecto del campo. La distorsión de la configuración nuclear no ocurre con la misma magnitud en moléculas pequeñas dado que tienen menor polarizabilidad nuclear, por lo que se valen principalmente de su polarización electrónica para modificar su momento dipolar. Por lo tanto, cuando la polarizabilidad electrónica de sistemas moleculares pequeños es baja, un proceso es sólo sensible al campo en los casos en que existe un importante cambio en el momento dipolar permanente. Debido a la alta polarizabilidad nuclear de los sistemas macromoleculares se observaron efectos importantes en una proteína completa con un campo eléctrico 4 veces menor al que se necesitó para obtener efectos similares en porfirinas aisladas.

Otro objetivo importante de este trabajo fue encontrar formas de determinar el campo eléctrico. Una manera fue llevada a cabo estimando el campo eléctrico a través de la teoría de la doble capa. Ésta es útil para la determinación del campo eléctrico en la superficie de electrodos sumergidos en una solución conductora. La otra técnica de determinación del campo se efectuó utilizando el corrimiento de las frecuencias vibracionales de grupos sonda dado por el campo eléctrico (efecto Stark vibracional). Esta técnica puede ser útil para la determinación del campo tanto en electrodos como en el interior de proteínas.

En el presente trabajo se han desarrollado teorías y estrategias experimentales necesarias para abordar el estudio del efecto del campo eléctrico en reacciones químicas de interés biológico. Queda aún por extender aún más las estrategias experimentales para el estudio sobre sistemas biológicos y lograr llevarlos a cabo. En este contexto, aún falta mejorar las

técnicas experimentales para la determinación de constantes de equilibrio en superficie y mejorar los métodos para determinar el campo eléctrico.

A nivel personal... en lo que se refiere a la forma de encarar el estudio y la metodología empleada; se pretendió abordar de la forma más completa y rigurosa posible, los diferentes temas presentados utilizando muchas y variadas herramientas experimentales y computacionales que estuvieron a mi alcance. Estas herramientas se han complementado adecuadamente en lo referido a la información que podían proporcionar cada una de ellas.

Durante este trabajo de tesis, considero que he aprendido a encarar desde distintos ángulos un problema que desde mi opinión resultó desde un principio muy ambicioso. Lograr responder las preguntas que se hicieron en esta tesis fue posible gracias a los numerosos casos de prueba y error que son parte esencial del aprendizaje, y a la interacción interdisciplinaria que tuve con las personas, tanto becarios como investigadores (incluyendo aquí a mis directores), que me proveyeron distintas perspectivas que me fueron guiando rumbo a estas metas. Resalto que por sobre todas las cosas he aprendido más por los intentos fallidos y los resultados negativos que fueron en cantidad un orden de magnitud mayor que los que aquí se presentaron. Me declaro completamente satisfecho por todo lo que he aprendido en este trabajo de tesis. Es mi deseo que mi esfuerzo sea útil en el desarrollo de esta área así como fuente de inspiración para otros.

V

Apéndice

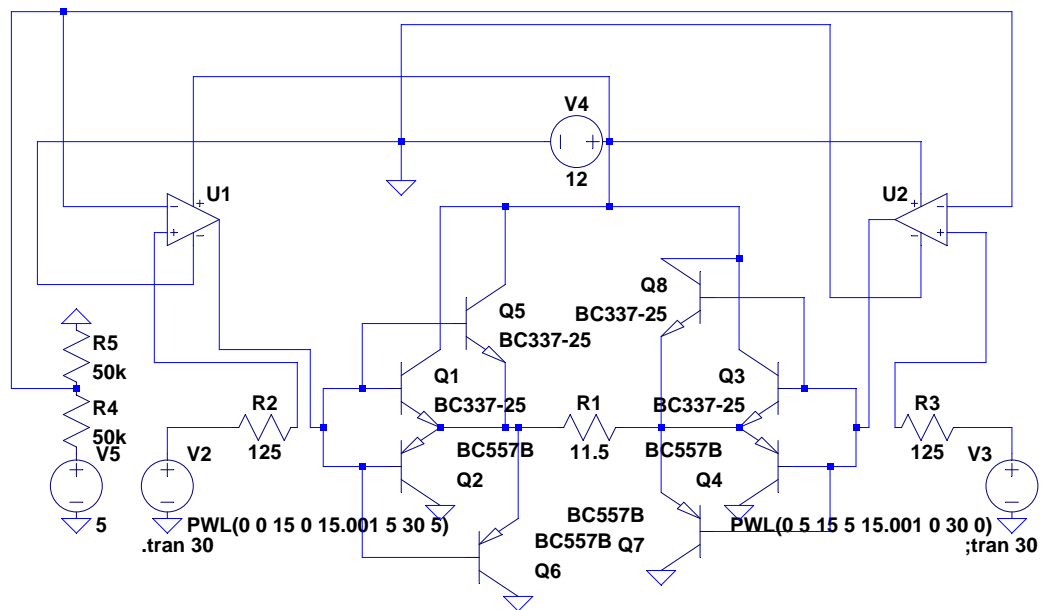


Figura V.6.1: Circuito electrónico que controla el dispositivo inmersor del electrodo

El estimador definido como:

$$\sigma = \frac{\nu(F) - \nu(-F)}{2F} \quad (\text{V.6.1})$$

Si la frecuencia es una función del campo polinomial de segundo grado entonces:

$$\nu(F) = aF^2 + bF + c \quad (\text{V.6.2})$$

$$\nu(-F) = aF^2 - bF + c \quad (\text{V.6.3})$$

Combinando V.6.1, V.6.2 y V.6.3 se obtiene que:

$$\sigma = \frac{2bF}{2F} = b \quad (\text{V.6.4})$$

el estimador provee el coeficiente de primer grado del polinomio que corresponde al *Stark Tunning Rate* según su definición y considerando que vale V.6.2:

$$\sigma = \left(\frac{\partial \nu}{\partial F} \right)_{F=0} = 2aF + b = b \quad (\text{V.6.5})$$

Figura V.6.2: Demostración de la propiedad del estimador de σ

Agradecimientos

Esta tesis fue escrita 100 % en Linux y fue posible gracias al Software Libre que es como debería ser todo el conocimiento patrimonio de la humanidad, particularmente el conocimiento científico.

Mi agradecimiento a todas las personas críticas que hacen ciencia con rigor y sólo por el propio placer de satisfacer nuestras inquietudes por comprender como funciona nuestro universo porque son los que me enseñan las cosas más valiosas.

Mi agradecimiento a todas las personas que piensan primero en todos antes que en si mismos porque son las que hacen a este mundo mejor, es por eso que las admiro y son lo que yo pretendo ser.

A Dios por proveerme de lo más elemental que necesito para vivir: mis seres queridos. Y en forma particular agradezco a mi esposa Laura que al tenerla a ella lo tengo todo. Le estoy agradecido por haberme dado fuerzas para que terminara esta tesis, además me soportó y me ayudó intelectualmente cuando no llegaba a terminar de estudiar para un parcial o de escribir la tesis a tiempo. A mi mamá que despertó mi autoestima enseñándome que puedo lograr todo lo que me proponga y gracias a ello pude concretar muchos de mis objetivos como esta tesis. A mi papá que fue el primero que comenzó a saciar mi sed por el conocimiento de comprender al mundo respondiendo mis primeras inquietudes avasallantes. A mis hermanitos Tuti, Titi y Leandrín porque siempre fueron mis mejores amigos de la vida y porque estaré eternamente conectado a ellos. A mis directores oficiales Fabio Doctorovich y Darío Estrin por soportarme y darme la oportunidad de trabajar con ellos y proveerme de los recursos necesarios para que pudiera terminar esta tesis. A Fabio particularmente porque al final entendió que soy incorregiblemente terco y me dejó libre para que pudiera hacer muchas de las cosas a mi modo. También por haberme dado fuerzas para seguir intentando cuando comenzaba a sentir frustración al creer que los experimentos parecían haber sido hechos en vano. A Darío, en especial por su eterno buen humor y buen trato, apoyo, paciencia y comprensión incondicional, porque siempre tiene una respuesta para todo que te ayuda a seguir adelante (no sólo el "te va a salir"), y por su excelente intuición científica. A Daniel Murgida porque esta tesis es una extensión de sus ideas y porque fue otro de mis directores

(un director no oficial) a quien constantemente recurrí por saber dar siempre una respuesta clara y precisa. A Peter Hildebrandt por prestarme sus equipos para hacer las mediciones Raman. A Marcelito Martí por su importante contribución al capítulo del citc y por rescatarme cuando mi pereza me secuestra. A Gabriel Gordillo por transferirme sus conocimientos de doble capa y electroquímica, por sus ideas que logré materializar en la máquina de inmersión de electrodos, por prestarme su laboratorio y por preocuparse y ayudarme a que lograra mi objetivo. A Ernesto Marceca por sus ideas prácticas y por proveerme de sus herramientas, componentes electrónicos y partes de CD-ROM fuera de funcionamiento que me permitieron arreglar cosas y armar dispositivos caseros. A Marcos Mobbili y Álvaro Carrera por proveerme de las mismas herramientas cuando Ernesto no estaba disponible. A Eliseo por haberme hecho el cono de teflón para evitar lo hiciera yo mismo y comprometiera el funcionamiento de su torno. A Mario Tagliazzuchi por sus charlas que me inspiraron para vencer muchas dificultades experimentales. A Seba Suárez por su ayuda, compañerismo y por sintetizarme la porfirina de cianuro. A Sara Bari por ponerme el Zn en la mesita y por hacerme junto con Diego Gómez una infinidad de porfirinas. A Mariano Fonticelli y a Roberto Salvarezza por las mediciones de STM y XPS. A Damián Scherlis por nuestras conversaciones científicas y las no científicas que me hacían sentir como si estuviera haciendo terapia. A Matías y a Cristian Rocha por su soporte técnico de PC. A Leo Boechi porque con su habilidad para hablar sin decir mucho me hace reír como ninguno, y también por llevarme incontables veces hasta la puerta de mi casa evitando que perdiera muchas horas de mi vida arriba del 107. A Lula por organizarme todo incluso la Luna de Miel. A Damián Omega por iniciarme en el lenguaje gráfico de TCL. A Damiancito Bikiel porque tenemos el mismo aire en la forma de pensar y trabajar. A Alejandra, que muy eficientemente siempre está dispuesta a ayudar. A Adrián que me permitió usar sus clusters. Y a lo que no se refiere a esta tesis pero sí al tiempo que pase con ellos, por todas las charlas de meriendas, a Juan, Cari, Nano, Ezequiel, Vero, Estefi, Yoshi, Diego M., Natt, Diego Gauto, Peter, Johan, Santi, Pau, Nati, Flavio, Charly, Dardo, Ariel (el pseudo-tucumano cantor del tema del verano), Analuz, y a los que me olvidé.

A mi nonno y mi nonna porque son mi ejemplo de personas maravillosas.

A mis tíos y primos porque siempre estuvieron conmigo.

A toda la familia de Laura porque también son mi familia (Luis, Sara, Paula, Ariel, Teresa, y demás tíos y primos).

A mis amigos.

A la gente respetable de mi país y a las cosas buenas que Argentina tiene como la Universidad pública. Al Departamento de Química Inorgánica Analítica y Química Física, y al INQUIMAE que me proveyeron el lugar de trabajo. Y finalmente al CONICET por financiar esta tesis.